

ECOLOGIA MICROBIANA E ASPECTOS FUNCIONAIS DE
COMPARTIMENTOS DO SISTEMA SOLO-RAIZ EM PLÂNTULAS DE
SOJA (*Glycine max* L.)

JOÃO PEDRO CAMPOS MATOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
02/2026

ECOLOGIA MICROBIANA E ASPECTOS FUNCIONAIS DE
COMPARTIMENTOS DO SISTEMA SOLO-RAIZ EM PLÂNTULAS DE
SOJA (*Glycine max* L.)

JOÃO PEDRO CAMPOS MATOS

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia Vegetal

Orientador: Dr. Fabio Lopes Olivares
Coorientadora: Dra. Sara Sangi
Miranda

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

ECOLOGIA MICROBIANA E ASPECTOS FUNCIONAIS DE
COMPARTIMENTOS DO SISTEMA SOLO-RAIZ EM PLÂNTULAS DE
SOJA (*Glycine max* L.)

JOÃO PEDRO CAMPOS MATOS

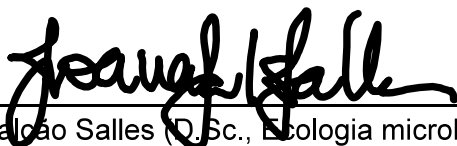
Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2026.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 CLÍCIA GRATIVOL GASPAR DE MATOS
Data: 29/04/2026 21:05:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Clícia Grativol Gaspar de Matos (D.Sc., Química Biológica) - UENF



Joana Falcão Salles (D.Sc., Ecologia microbiana) - Universidade de Groningen

Documento assinado digitalmente
 LUC FELICIANUS MARIE ROUWS
Data: 30/04/2026 12:07:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luc Felicianus Marie Rouws (D.Sc., Química Biológica) - EMBRAPA Agrobiologia

Documento assinado digitalmente
 FABIO LOPES OLIVARES
Data: 22/04/2026 13:32:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fabio Lopes Olivares (D.Sc., Agronomia – Ciências do Solo) - UENF
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente
 SARA SANGI MIRANDA
Data: 24/04/2026 17:21:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sara Sangi Miranda (D.Sc., Genética e melhoramento de plantas) - UENF
Coorientadora

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
02/2026

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

M433

Matos, João Pedro Campos.

Ecologia microbiana e aspectos funcionais de compartimentos do sistema solo-raiz em plântulas de soja (*Glycine max* L.) / João Pedro Campos Matos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

100 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientador: Fabio Lopes Olivares.

Coorientadora: Sara Sangi Miranda.

1. Rizosfera. 2. Microbioma. 3. Ecofisiologia. 4. Metabarcoding. 5. Exsudação. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

*Aos meus pais, Wanderson e Vanessa,
por toda motivação e por sonharem junto
comigo; à minha irmã, Duda, cuja distância
não fez apagar o carinho e afeto; à Letícia,
minha noiva pelo amor e companheirismo
presentes em cada detalhe, dedico este
trabalho. Com amor, João!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Wanderson Dias Matos e Vanessa Campos Madruga Matos, por serem os incentivadores da minha jornada, me ensinando o amor, a importância da educação como ferramenta transformadora, e valores que levarei para sempre comigo. Agradeço também aos demais membros da minha família pelo carinho, pela confiança depositada em mim e pela motivação.

Agradeço à Letícia Arcelino Ribeiro, meu amor, por cada momento de troca, carinho e companheirismo que deram cor à vida, e também. Aprender com você é um remédio diário.

Agradeço a Deus, grande arquiteto do universo e regente das leis naturais, que iluminou a minha caminhada.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela estrutura, aporte e conhecimento que me foi passado.

Agradeço aos colegas de trabalho que contribuíram no meu caminho: Rafael, Ribeiro, Letícia Oliveira, Letícia Cespom, Saulo Pireda, Beatriz Barcelos, Rayane, Ildeane, Gabriela Alves, João Vitor e Daniel.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Fabio Lopes Olivares e à minha coorientadora, Dra. Sara Sangi, pelo conhecimento e instrução que deram vida a esse trabalho, e pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional.

Agradeço aos amigos da minha cidade natal com os quais mantive contato, e também ao professor Jorge H. Petretski pela amizade, motivação e conversas socráticas no pátio do CBB.

Agradeço aos professores e pesquisadores que aceitaram o convite para participar da minha banca, e avaliar o meu trabalho.

Cada um de vocês representa uma peça fundamental no meu percurso até aqui e também na minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; bem como da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Lista de Figuras

Figura 1. Diferenças na distribuição de matéria orgânica, porosidade, concentração de nutrientes e gradientes de temperatura, oxigênio e pH ao longo do perfil estratificado do solo. (Fonte: Autoria própria, elaborado no Biorender.com).

Figura 2. Ilustração que representa as diferentes atividades e nichos que podem ser encontrados em cada um dos polos de uma raiz madura. (Fonte: Autoria própria, elaborado com Biorender.com).

Figura 3. Mapeamento de patentes oriundas da pesquisa por “Root microbiome” reunidas em classes referentes aos seus produtos e serviços. (Fonte: Autoria própria, elaborado com Canva.com).

Figura 4. Mapeamento de patentes oriundas da pesquisa por “Glycine max AND Root AND Bacteria” reunidas em classes referentes aos seus produtos e serviços. (Fonte: Autoria própria, elaborado com Canva.com).

Figura 5. Esquema ilustrativo da origem e da forma de coleta de cada compartimento considerado neste trabalho. (Fonte: Autoria própria, elaborado com Biorender.com).

Figura 6. Plântula de soja após 10 dias de crescimento em casa de vegetação com as regiões da raiz avaliadas neste trabalho indicadas e nomeadas. (Fonte: Autoria própria, elaborado com Canva.com).

Figura 7. (A) Placas com meios de cultura seletivos inoculadas com a diluição de 10^{-3} células de cada compartimento estudado. E (B) meios de cultura semi-sólidos LGI e JNFB, inoculados com a diluição de 10^{-4} células, exibindo película aerotática.

Figura 8. A aplicação de índices ecológicos, como forma de medir padrões de consumo de substrato pelas bactérias, permite compreender melhor a diversidade dessa capacidade metabólica (A) e a uniformidade desse consumo (B). O valor médio do desenvolvimento da cor dos poços (AWCD) representa a progressão do consumo ao longo de toda a placa em cada comunidade (C).

Figura 9. Mapa de calor mostrando a taxa de consumo final de 31 substratos diferentes pelas comunidades de cada compartimento, cultivadas em Ecoplacas Biolog por 112 horas de incubação. Tons mais escuros de vermelho indicam maior consumo, enquanto tons mais escuros de cinza indicam menor consumo. Ao lado do mapa de calor está sinalizado a que grupo de fontes de carbono pertence cada substrato.

Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura das duas regiões radiculares analisadas: Zona de ramificação (1) e Coifa + Zona de alongamento (2), destacando traços da sua estrutura e a presença de microrganismos na sua superfície.

Figura 11. Raízes coradas com tetrazólio indicando a presença de micro-organismos em regiões com acúmulo de pigmentação avermelhada.

Figura 12. Análise de componentes principais capaz de explicar a distinção entre os compartimentos a partir da raiz total (CR) por meio de seus genes diferencialmente expressos.

Figura 13. Os gráficos “vulcão” indicam os padrões de expressão comparados entre a raiz total (CR) e as zonas RT1 (A) e RT2 (B). Enquanto os conjuntos (C) mostram o número de genes Up e Down regulados, únicos e compartilhados, em cada compartimento quando comparados à raiz completa.

Figura 14. Os 30 termos “Gene Ontology” mais expressos no tecido da coifa (RT1) em comparação à raiz completa.

Figura 15. Os 30 termos “Gene Ontology” mais expressos no tecido da zona de ramificação (RT2) em comparação com a raiz completa.

Figura 16. Mapas de calor comparam a expressão diferencial de genes ligados à produção de compostos relevantes para a comunicação entre a raiz e microrganismos fixadores de nitrogênio. Na escala de cores, o vermelho indica valores mais elevados de expressão, enquanto o azul indica valores menores (a escala foi elaborada com base no $\text{Log}_2 \text{TPM} + 1$ e na média das réplicas). Os códigos GLYMA referem-se à nomenclatura de cada gene avaliado.

Figura 17. Mapas de calor comparam a expressão diferencial de genes ligados à produção de compostos de carbono. Na escala de cores, o vermelho indica valores mais elevados de expressão, enquanto o azul indica valores menores (a escala foi elaborada com base no $\text{Log}_2 \text{TPM} + 1$ e na média das réplicas). Os códigos GLYMA referem-se à nomenclatura de cada gene avaliado.

Figura 18. Número de unidades formadoras de colônia resultante da contagem (A), seguido do número de fluoresceína liberada pela comunidade de cada compartimento (C) e do número mais provável de células/mL (NMP) nos meios de cultura JNFB (B) e Igi (D).

Figura 19. Índices ecológicos aplicados às comunidades bacterianas dos compartimentos, que representam o número de espécies (I), a diversidade alfa (II) e a diversidade beta (III).

Figura 20. Abundância relativa das dez ordens de bactérias mais abundantes em cada compartimento analisado (I). Influência de cada zona do eixo solo-planta na distribuição dos 10 filos de bactérias mais abundantes observados (II). O diagrama de Venn destaca o número de táxons exclusivos e compartilhados em cada compartimento (III).

Figura 21. Índices ecológicos aplicados às comunidades fúngicas dos compartimentos, que representam o número de espécies (I), a diversidade alfa (II) e a diversidade beta (III).

Figura 22. Abundância relativa das dez ordens de fungos mais abundantes em cada compartimento analisado (I). Influência de cada zona do eixo solo-planta na distribuição dos 10 filos de fungos mais abundantes observados (II). O diagrama de Venn destaca o número de táxons exclusivos e compartilhados em cada compartimento (III).

Lista de Quadros

Quadro 1. Regiões tratamento, inseridas como compartimentos no trabalho, acrescidas de suas siglas e a forma de coleta de cada uma

Quadro 2. Meios de cultura ou compostos principais presentes em meios mínimos de cultura, seguidos dos grupos microbianos alvo de cada um deles, bem como suas referência

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição do substrato: propriedades físico-químicas

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação das regiões de interesse para análise de metabarcoding

Tabela 3. Identificação das amostras e do número de reads no início (input) e ao final do processamento bioinformático (non-chimeric), seguida da porcentagem de retenção de leituras.

Tabela 4. Identificação das amostras e do número de reads no início (input) e ao final do processamento bioinformático (non-chimeric), seguida da porcentagem de retenção de leituras.

Tabela 5. Estatísticas do sequenciamento RNA-seq e resultados de mapeamento das amostras, incluindo número total de reads (Total Reads), reads mapeadas ao genoma de referência (Mapped Reads), reads mapeadas de forma única (Uniq Mapped Reads), reads com múltiplos alinhamentos (Multiple Map Reads) e conteúdo de guanina e citosina (GC content %).

Lista de abreviaturas e siglas

BS - Solo a granel

CR - Raiz completa

DEG/GDE - Genes diferencialmente expressos

FDA - Diacetato de fluoresceína

GC - guanina e citosina

ID - Identificador

NMP -Número mais provável de células

NQ - Não quimérico

SR1 -Rizosfera da zona de alongamento + coifa

SR2 -Rizosfera da zona de ramificação + pelos

RT0 -Tecido da radícula

RT1 -Tecido da zona de alongamento + coifa

RT2 -Tecido da zona de ramificação + pelos

UFC -Unidades formadoras de colônia

VOC/COV – Composto orgânico volátil

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Revisão de Literatura.....	19
2.1. Introdução.....	19
2.2. O Solo.....	20
2.3. A Anatomia da raiz.....	23
2.4. Interações microbianas.....	26
Bibliografia.....	31
3. Revisão em Bancos de Propriedade Intelectual.....	38
4. Objetivos.....	43
4.1. Objetivo geral.....	43
4.2. Objetivos específicos.....	43
5. Materiais e Métodos.....	44
5.1 Material vegetal.....	44
5.2 Estimação da fração culturável de microrganismos de solo e raiz.....	46
5.3 Atividade microbiana.....	48
5.4 Microscopia de varredura.....	48
5.5 Microscopia óptica de campo claro.....	49
5.6 Perfil metabólico das comunidades microbianas.....	49
5.7 Extração de DNA e Sequenciamento.....	51
5.8 Extração de RNA e Sequenciamento.....	52
5.9 Análise estatística e elaboração de gráficos e figuras.....	54
6. Resultados.....	55
6.1 Capacidade funcional das comunidades.....	55
6.2 Microscopia e Expressão gênica diferencial em raízes.....	60
6.3 Dimensões, distribuição e ecologia das comunidades.....	69
7. Discussão.....	79
9. Perspectivas Futuras.....	85
10. Referências Bibliográficas.....	86
APÊNDICE A.....	97

RESUMO

MATOS, João Pedro Campos. Me., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2026; **Ecologia microbiana e aspectos funcionais de compartimentos do sistema solo-raiz em plântulas de soja (*Glycine max* L.)**. Orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares. Coorientadora: Dra. Sara Sangi.

A busca por práticas agrícolas sustentáveis tem destacado os microbiomas vegetais como ferramentas estratégicas para o avanço da biotecnologia. A estruturação desses microbiomas resulta de um processo coevolutivo entre plantas e microrganismos, modulado pelas características físico-químicas e biológicas do micro-habitat, o que torna a compreensão dessas interações essencial para o desenvolvimento de tecnologias agrícolas mais eficientes. Considerando a hipótese de que regiões distintas da raiz e da rizosfera abrigam comunidades microbianas diferenciadas, este trabalho avaliou a distribuição e a atividade bacteriana em plântulas de soja cultivadas por 10 dias em casa de vegetação. Foram amostrados: solo sem influência radicular (BS), rizosferas da coifa-zona de alongamento (SR1) e da zona pilífera-ramificação (SR2), além dos tecidos correspondentes (RT1 e RT2). A radícula germinada *in vitro* também foi analisada para identificar bactérias residentes da semente (RT0). O DNA total foi extraído e submetido ao sequenciamento por metabarcoding (16S rRNA, região V4, primers 515F e 806R), o que revelou diferenças na composição e na diversidade taxonômica entre os compartimentos. O método de hidrólise do FDA apresentou maior atividade microbiana em SR1/SR2. A contagem e a estimativa do Número Mais Provável (NMP) divergiram: mais colônias em BS e SR2 e valores menores de NMP/mL nesses mesmos compartimentos, indicando um processo de especialização em direção ao centro do eixo. As microscopias óptica e de varredura elucidam os compartimentos radiculares como estruturas distintas, colonizados de forma distinta. A inoculação em Ecoplaças® e em meios seletivos apontou diferenças no uso de nutrientes e de fontes de carbono pelas comunidades, indicando um metabolismo diverso. A expressão gênica diferencial de transcritos envolvidos na interação microrganismo-planta, identificou regulação distinta entre R1-R2 possivelmente capaz de influenciar no estabelecimento de comunidades microbianas adjacentes orientadas à diferentes nichos e funções. Os resultados confirmam a hipótese de

compartimentalização do microbioma rizosférico e reforçam sua potencial aplicação na prospecção de microrganismos e no desenvolvimento estratégico de bioinoculantes mais precisos e adaptados às demandas fisiológicas da soja. Contribuindo assim, para uma agricultura mais tecnológica e sustentável.

Palavras-chave: Compartimentalização, Microbioma, Biotecnologia

ABSTRACT

MATOS, João Pedro Campos. M.Sc., State University of Northern Rio de Janeiro Darcy Ribeiro. March 2026; **Microbial ecology and functional aspects of soil-root system compartments in soybean seedlings** (*Glycine max* L.). Supervisor: Prof. Fabio Lopes Olivares. Co-supervisor: Dr. Sara Sangi.

The search for sustainable agricultural practices has highlighted plant-associated microbiomes as strategic tools for biotechnological advancement. The assembly of these microbiomes results from a long-term coevolutionary process between plants and microorganisms, modulated by the physicochemical and biological characteristics of the microhabitat, making the understanding of these interactions essential for the development of more efficient agricultural technologies. Considering the hypothesis that distinct root and rhizospheric regions harbor differentiated microbial communities, this study evaluated the distribution and activity of bacteria in soybean seedlings cultivated for 10 days under greenhouse conditions. Samples were collected from bulk soil without root influence (BS), rhizospheres of the root cap–elongation zone (SR1) and the root hair–branching zone (SR2), as well as from the corresponding root tissues (RT1 and RT2). An *in vitro* germinated radicle was also analyzed to identify seed-resident bacteria (RT0). Total DNA was extracted and subjected to metabarcoding sequencing (16S rRNA, V4 region, primers 515F and 806R), revealing differences in taxonomic composition and diversity among compartments. The fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis assay indicated higher microbial activity in SR1 and SR2. Colony counts and Most Probable Number (MPN) estimates showed divergent patterns, with higher colony counts in BS and SR2 and lower MPN/mL values in these same compartments, indicating a process of specialization toward the center of the root axis. Light and scanning electron microscopy revealed root compartments with distinct structural features and differential patterns of microbial colonization. Inoculation in EcoPlates® and selective media indicated differences in nutrient and carbon source utilization by the communities, revealing metabolically diverse assemblages. Differential gene expression analysis of transcripts involved in plant–microorganism interactions identified distinct regulation between R1 and R2, potentially influencing the establishment of adjacent microbial communities oriented toward different niches

and functions. These results confirm the hypothesis of rhizospheric microbiome compartmentalization and reinforce its potential application in microbial prospecting and in the strategic development of more precise bioinoculants tailored to the physiological demands of soybean, thereby contributing to a more technological and sustainable agriculture.

Keywords: Compartmentalization, Microbiome, Biotechnology

1. Introdução

A interação entre plantas e microrganismos resulta de um processo coevolutivo que se desenvolve desde que as plantas colonizaram o ambiente terrestre (CHENG et al., 2019; LYU et al., 2021). Para o estabelecimento dessa relação, as plantas lançam mão de sua capacidade de exsudar compostos de carbono que, ao interagirem com a microbiota do solo, modificam a matriz do solo, facilitando o acesso da planta a nutrientes e minerais (OBURGUER & JONES, 2018). Esses compostos funcionam como sinais quimiotáticos, atraindo ou repelindo microrganismos, e como fonte nutricional, modulando a composição e funcionalidade da comunidade microbiana na interface do sistema radicular com o solo adjacente. Conhecido como rizosfera, esse compartimento é descrito como uma fina camada conectada ao rizoplane, com alta atividade microbiana decorrente do forte impacto da rizodeposição de compostos, capaz não só de atrair certas populações de microrganismos, mas também de influenciar sua proliferação (QIU et al., 2024). Essa aproximação, consequência da seleção natural, transformou-se ao longo do tempo em uma relação sólida. Hoje sabemos, como via de regra, que as plantas são capazes de atrair microrganismos que favorecem o seu crescimento e as auxiliam no enfrentamento de estresses ambientais (GLICK & GAMALERO, 2021), formando comunidades complexas.

A essas comunidades que abrigam um conjunto variado de genes e um amplo teatro de atividades em um habitat determinado, dá-se o nome de microbioma (BERG et al., 2020), e há uma miríade de fatores que podem influenciar diretamente o estabelecimento dessa interação sofisticada. As condições do solo e o clima da região são exemplos importantes, visto que o impacto das mudanças climáticas no microbioma do solo pode se refletir na capacidade desse microbioma de promover o crescimento vegetal (BOYLE et al., 2024). Ainda, a escassez de nutrientes ou a sua distribuição desigual na matriz do solo estimula a atividade de grupos bacterianos, como é o caso das bactérias produtoras de sideróforos (AHMED & HOLMSTRÖM, 2014). Mas, para além do ambiente, da espécie e do genótipo do hospedeiro, que fornecerão o habitat à microbiota associada, também determinarão o seu recrutamento, em razão do diálogo molecular entre os indivíduos. Esse diálogo é representado pela emissão de moléculas sinalizadoras pela planta, que são

captadas e geram uma resposta também no nível molecular pelos microrganismos que as recebem (e vice-versa). Alguns casos já foram elucidados; um dos mais bem descritos é o papel de flavonoides e isoflavonoides secretados pelas leguminosas, como soja e feijão, para atrair bactérias do gênero *Rhizobium* (ZHANG et al., 2025), que, após uma complexa troca de sinais e proteínas (SANTOS & REIS, 2008), são capazes de penetrar nas raízes, estabelecer-se e formar nódulos fixadores de nitrogênio em plantas dessa família. Além do mais, tratando-se de uma comunidade, a interação microrganismo-microrganismo também detém o poder de moldá-la (HAQ et al., 2014). Grande parte do que se sabe até hoje sobre a interação entre microrganismos do solo baseia-se em situações antagônicas, favorecidas por temas como o biocontrole e o combate a patógenos (BORO et al., 2022). Mas algo que influencia fortemente o estabelecimento e o conceito de comunidades microbianas e vem ganhando destaque são as interações positivas. À partir da elaboração de uma comunidade microbiana sintética, ROSS et al. (2025) apresentaram um modelo autosustentável e mutualístico onde bactérias colaboram entre-si por meio da produção de aminoácidos, e em certo ponto também com caráter comensal, à medida em que uma aproveita a fonte de carbono de outra sem retribuição. Ainda, a produção de biofilme bacteriano é capaz de tornar positiva a interação entre bactérias outrora antagônicas, quando em vida livre (KASETTY et al., 2021), ou mesmo de ancorar bactérias às hifas fúngicas, garantindo abrigo e dispersão (PELEG, HOGAN & MYLONAKIS, 2010).

A descoberta recorrente de detalhes da comunicação entre plantas e microrganismos do solo tem propiciado avanços tecnológicos, mas também revelado lacunas a serem exploradas. A compartimentalização do microbioma de um órgão vegetal é uma proposta que permite expandir os horizontes da prospecção de microrganismos e enzimas, bem como da avaliação funcional de indivíduos inseridos em comunidades. O ato de fragmentar um microbioma em seções menores parte da ideia de que as diferenças anatômicas e fisiológicas dentro de um sistema radicular, que vão de encontro a um solo com perfil estratificado, são capazes de formar nichos tão distintos e complexos que valem a pena serem observados um por um. Essa abordagem contrasta com o método tradicional de amostragem de "toda a raiz", que costuma proporcionar uma visão agregada e menos detalhada das interações microbianas. Ao compartimentar,

podemos identificar com maior precisão as interações específicas e as potencialidades de cada segmento da raiz. O ato de fragmentar um microbioma em seções menores parte da soma de fatores (I) anatômicos, como diferenças estruturais na arquitetura radicular; (II) fisiológicos, como diferenças na produção de hormônios nas zonas radiculares; e, principalmente, (III) fatores moleculares, como a exsudação, que varia em diferentes regiões da raiz (KRANAWETTER et al., 2021).

A extremidade inferior da raiz é revestida pela coifa que exerce a função de explorar as camadas mais profundas do solo (KUMPF & NOWAK, 2015) ao mesmo tempo que protege o meristema apical radicular com o seu tecido rígido. É também a partir da coifa que ocorre a liberação de “*Border Cells*” (DRIOUCH et al., 2013). Essas células delimitam a fronteira entre a extremidade radicular e o solo, exercendo a comunicação entre ambos por meio de processos de sinalização, com base em estímulos do meio ou no contato com outros microrganismos (CANELLAS & OLIVARES, 2017). Para facilitar o processo de penetração, a coifa secreta uma mucilagem que pode interagir com microrganismos do solo, já que é extremamente atrativa para alguns grupos (NAZARI, 2021; JIANG et al., 2022) e pode repelir outros (DRIOUCH et al., 2021). Na zona de ramificação, as raízes são mais maduras e estruturalmente mais rígidas, exercendo a função de se fixar no solo e forragear horizontalmente em busca de nutrientes presentes nos estratos mais próximos à superfície (JOBAGY & JACKSON, 2001). Além disso, essa região pode apresentar nódulos de fixação de nitrogênio em plantas leguminosas (HUNGRIA & NOGUEIRA, 2022). Outro fator importante é que a emergência das raízes laterais deixa cicatrizes e forma axilas, que servem como portas de entrada para microrganismos endofíticos (VASSE, FREY & TRIGALET, 1995).

Diante desse cenário, emerge a hipótese de um novo modelo para o estudo de microbiomas que chama a atenção para as peculiaridades de cada possível comunidade – a compartimentalização: Diferentes regiões do eixo radicular e rizosférico, com origens e estruturas próprias, abrigam comunidades distintas, e a partir disso, é importante estudar o microbioma de raiz e rizosfera, não mais como um grande conglomerado fechado, mas sim dividido em parcelas de acordo com a região anatômica que ocupam e as influências às quais são alvo, seja por parte da planta ou do solo. Essa se mostra uma estratégia eficaz na prospecção de

microrganismos, orientada pelas especificidades funcionais de cada compartimento, bem como no desenvolvimento de tecnologias mais assertivas, guiadas pelas peculiaridades da cultura (que, neste caso, é a soja) e de seus microbiomas associados.

Assim, ao confirmar essa hipótese, esse trabalho proporciona a elaboração de um conhecimento acurado capaz de contribuir para temas que permeiam a ecologia microbiana e de enriquecer, de forma integrativa, o que se sabe sobre o estabelecimento, o desempenho e a diversidade de comunidades microbianas da rizosfera. No campo da biotecnologia, o presente estudo estabelece meios para a produção de bioinsumos sustentáveis e modernos para a agricultura, uma vez que a interação entre plantas e microrganismos representa atualmente uma alternativa consolidada e segura aos fertilizantes sintéticos, além de ser certificadamente eficiente no desenvolvimento de uma agricultura sustentável, capaz de assegurar a segurança alimentar (DWIBEDI et al., 2022; SUMAN et al., 2022).

2. Revisão de Literatura

2.1. Introdução

O conceito de microbioma, recentemente atualizado, caracteriza-se por apresentar dois principais componentes – a microbiota de um determinado espaço e o seu teatro de atividades, envolvendo, por conseguinte, todo o material genético presente (BERG et al., 2020). Já o conceito de rizosfera pode ter por definição, a região do solo onde a raiz exerce a sua esfera de influências (KUPPE et al., 2022) ou seja, uma zona do solo intimamente ligada às raízes no espaço, e alvo direto da sua influência com objetivos de absorção de nutrientes e água (DOTANIYA & MEENA, 2014), liberação de compostos, recrutamento e interação com microrganismos (HASSAN; MCINORY & KLOEPPER, 2019), e processos de percepção e sinalização (VENTURI & KEEL, 2016).

É comum que estudos que compreendem a rizosfera tratem da completude do corpo da raiz, deixando, portanto, de levar em consideração a especificidade de

diferentes regiões radiculares e de diferentes estratos do solo. Ao longo do eixo radicular, é possível encontrar regiões distintas desde a sua formação até a função que exercem (GLÓRIA & GUERREIRO, 1992), como raízes laterais, zona pilífera, zona de alongamento e coifa. O solo, por sua vez, com seu perfil estratificado, se organiza no eixo vertical em diferentes parcelas de acordo com a distribuição de nutrientes (GIEHL & VON-WIRÉN, 2014) e fatores físico-químicos que levam em consideração a sua mineralogia e a disposição dos seus componentes (MUNSIRI; BOYD & HAJEK, 1995).

Tendo por base essa realidade, a presente revisão chama a atenção para os três principais agentes que compõem o microbioma rizosférico — o solo, a raiz vegetal e os microrganismos —, a partir dos quais é possível elaborar arranjos distintos e sofisticados, teorizados como compartimentos.

2.2. O Solo

Dois séculos atrás, Dokuchaev e Marbut conceberam a ideia de que os solos poderiam ser seccionados e analisados em horizontes segundo os traços morfológicos e físico-químicos de cada estrato (BRIDGES, 1993). A composição dos horizontes mais profundos é um reflexo da rocha matriz que originou aquele solo, enquanto as camadas superiores recebem forte influência dos processos naturais de decomposição que geram aportes de matéria orgânica, bem como de eventos climáticos (lixiviação, intemperismo) e da interferência da biota (RICE et al., 2002). A relação entre esses fatores e o material de origem define a porosidade do solo, na qual, geralmente, as camadas inferiores sucumbem ao peso das superiores e tornam-se compactas, com baixa porosidade entre os agregados, enquanto, nas superiores, tende-se a formar espaços maiores entre os agregados. Essa porosidade, que permite maior aeração e maior capacidade de retenção de água, é, segundo MAGDOF et al. (2000), um fator limitante ao crescimento populacional microbiano.

A distribuição de nutrientes através do perfil do solo também é uma marca da distinção de seus horizontes. elementos como nitrogênio, fósforo e carbono orgânico, costumam se acumular nas camadas superiores do solo (WANG & TANG,

2021), e rapidamente incorporados aos macro e microagregados e reintroduzidos nos seus ciclos naturais (SILVA et al. 2023). Enquanto isso, elementos móveis, como sulfatos e nitratos, ou provenientes da rocha matriz, são acumulados em camadas mais profundas, criando um desafio para raízes em crescimento (GIEHL & VON WIRÉN, 2014). E, na investida para adquirir esses nutrientes, as plantas liberam compostos orgânicos que acabam por atrair grupos de microrganismos interessados em utilizá-los, dando origem ao que conhecemos como rizosfera (NA et al., 2022). Diante dessa variação espacial, as raízes laterais, distribuídas na porção superior do eixo dedicam-se a forragear nutrientes abundantes nos horizontes superiores como O e A, enquanto a coifa, cumprirá o papel de penetrar camadas profundas colonizando novos espaços em busca de água, e em função do gravitropismo (GIEHL & VON WIRÉN, 2014; SU et al., 2017). Assim, é natural que as raízes secretem compostos orgânicos distintos nos polos do eixo radicular (PAVINATO & ROSOLEM, 2008). Assim, reforça-se a teoria dos nichos e compartimentos, cuja formação ocorre bilateralmente, por meio das trocas entre raízes e o solo.

Fatores abióticos intrínsecos ao estabelecimento de comunidades microbianas se dispõem em gradientes verticais no solo, segregando ainda mais os seus estratos. A presença de matéria orgânica nos horizontes O e A, seguida de processos de composição e incorporação à matriz, acaba por acidificar essas regiões, podendo atingir valores de pH entre 3 e 4, que aumentam em camadas mais profundas até a neutralidade (pH = 6-7) (RAUBUCH & BEESE, 2005). Essa variação do potencial hidrogeniônico exerce grande influência no desenvolvimento de comunidades microbianas. Como demonstram WANG et al. (2019), o pH do solo influencia mais a diversidade microbiana do que a presença ou ausência de nutrientes. A temperatura e a umidade também aparecem como fatores determinantes do microbioma, em uma dinâmica diretamente conectada à estratificação do solo. Valores entre 20% e 40% de capacidade de campo são ótimos para a colonização e atividade bacteriana, enquanto 60% de capacidade favorece a atividade fúngica (BOROWIK & WYSZKOWSKA, 2016). Essa boa capacidade, somada a valores mais elevados de temperatura, torna a superfície do solo (horizontes O/A) mais ativa microbiologicamente; no entanto, essa região é alvo direto de variações ambientais e apresenta maiores taxas de evapotranspiração,

estando mais sujeita a eventos de seca ou de saturação (CAPUANI et al., 2012). Esses eventos extremos inibem a atividade microbiana na superfície, e reduzem a sua biomassa em até 50%, enquanto camadas mais profundas com isolamento térmico (horizonte B em diante), apesar de mais frias e conseqüentemente menos ativas, se mostram mais estáveis e resilientes (GÖMÖRYOVÁ et al., 2013).

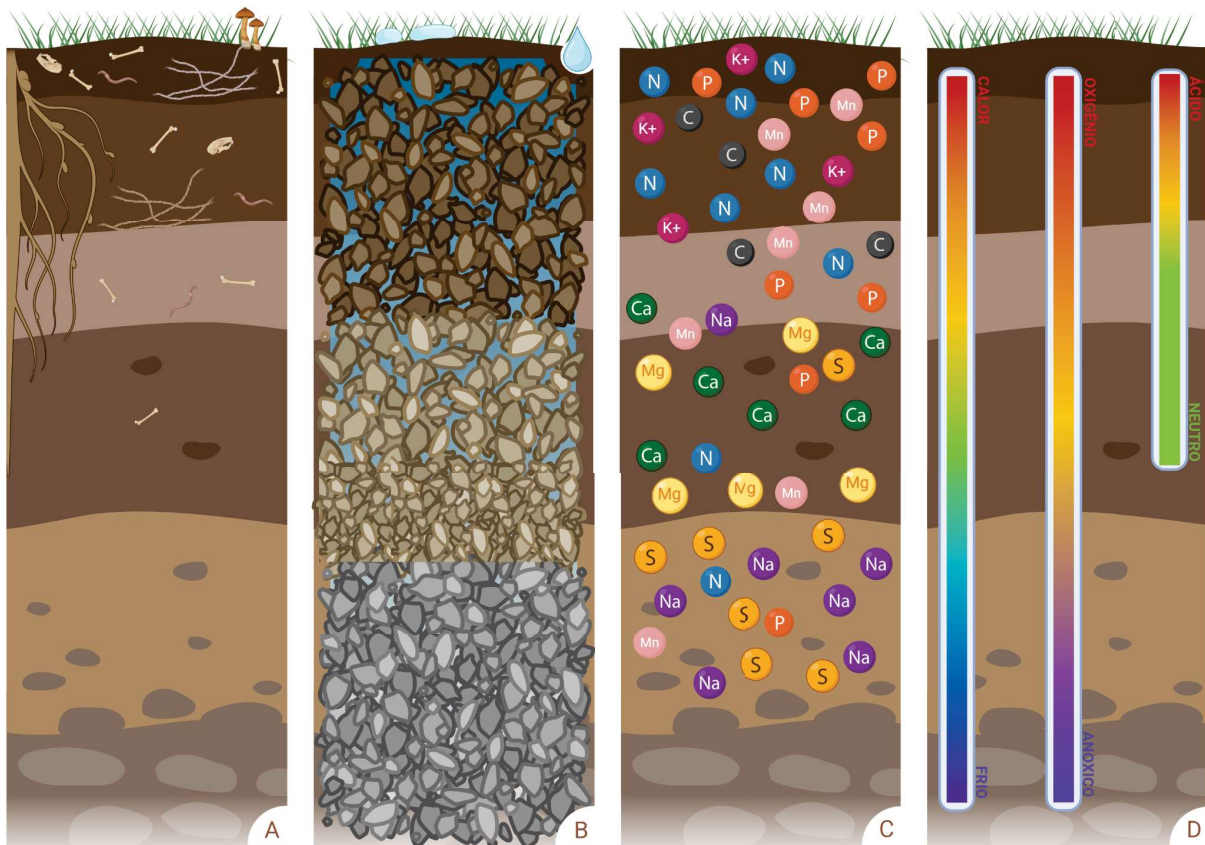


Figura 1. As colunas de solo apontam diferenças no seu perfil em função da estratificação: na coluna (A), a distribuição de matéria orgânica em decomposição, bem como o volume de ramificação radicular. Na coluna (B), a porosidade do solo, acompanhada por um gradiente de umidade e de aeração. Em (C), a coluna indica a concentração de nutrientes nas camadas do solo. (D) Mostra os gradientes de temperatura, oxigênio e pH ao longo do perfil estratificado do solo. (Fonte: Autoria própria, elaborado no Biorender.com).

Deste modo, a variação espacial observada entre os horizontes do solo é capaz de criar nichos ecológicos a serem ocupados por diferentes indivíduos e comunidades da fauna e da flora, bem como por microrganismos que, de acordo com suas especificidades bioquímicas e fisiológicas, serão capazes de sobreviver

às condições oferecidas por cada horizonte e se multiplicar a partir de seus substratos e substâncias disponíveis (BATTHARAI; BATTHARAI & PANDEI, 2015).

2.3. A Anatomia da raiz

A raiz é o órgão responsável pela conexão das plantas ao solo. Nessa imersão, as raízes vão se expandir na busca de água e nutrientes, guiadas no sentido vertical pela coifa, seguidas pela zona de alongamento e, no sentido horizontal, pelas raízes laterais. O gravitropismo é um fenômeno fundamental na orientação do crescimento radicular (BLANCAFLOR, 2015), e sua atuação é conjunta a processos hormonais e de nível molecular: a auxina desempenha papel central no gravitropismo radicular, sendo responsável pela redistribuição assimétrica do crescimento celular e pela consequente curvatura da raiz (SU et al., 2017). Algumas células das coifas contêm grânulos de amido chamados estatólitos, cuja sedimentação, devido à diferença de densidade (BAND et al., 2012), desencadeia a polarização da auxina, regulada por transportadores da família PIN e AUX1/LAX (ADAMOWSKI & FRIML, 2015; XI et al., 2016). Esse acúmulo diferencial de auxina modula a resposta gravitrópica. Além disso, a auxina não está presente apenas no final dessa cadeia, mas também no início, regulando a expressão de genes envolvidos na produção de estatólitos (ZHANG et al., 2019).

Raízes laterais, embora tenham origem diferente da raiz principal – advêm do periciclo e não do meristema apical radicular (SINGH et al., 2023) – compartilham características anatômicas e funcionais, como a presença de uma coifa e de uma zona de alongamento. Além disso, suas coifas também possuem estatólitos, no entanto sua resposta ao gravitropismo difere da raiz principal devido a expressão diferencial dos genes transportadores PIN (BABA et al., 2022). Essa diferença faz com que a raiz, ao atingir determinado ângulo, chamado ângulo de ponto de ajuste gravitrópico, interrompa a curvatura, e cresça em linha reta, se ajustando gradualmente (ROYCHOUDHRY et al., 2017), em um processo que liga e desliga, ora resistindo, ora se entregando ao gravitropismo, garantindo uma exploração mais eficiente do solo para absorção de água e nutrientes (LYNCH et al., 2022).

Outras diferenças se aprofundam durante o desenvolvimento radicular, o que amplia as diferenças anatômicas. É o caso da suberização (SU et al., 2023): a formação de uma lamela composta por suberina que vai recobrir a parede celular das células da raiz, primeiro na endoderme e, com o passar do tempo, na epiderme, no entanto, sem alcançar a zona de alongamento ou a extremidade radicular. A suberina participa da regulação osmótica e controla a perda de íons (DE SILVA et al., 2021), mas também forma um nicho atrativo para certos grupos de microrganismos como fungos capaz de degradar a molécula (KOLATTUKUDY, 1981; MARTINS et al., 2014), mas também bactérias patogênicas como *Streptomyces scabei*, cuja virulência está ligada ao uso do súber como fonte de carbono, e porta de infecção (PADILLA-REYNAUD et al., 2015; BEAULIEU et al., 2016). Mesmo sendo atrativo para certos patógenos, a suberina é uma das ferramentas que as raízes dispõem para se defender (CHEN et al 2022) contra o ataque de microrganismos (BARROS et al., 2024), ou, de acordo com HOLBEIN et al. (2019), exercendo uma barreira física contra nematoides, e regulando o fluxo de nutrientes durante a infecção.

Enquanto isso, na ponta das raízes, a coifa guia o aprofundamento da raiz no solo, protegendo o meristema apical e os demais tecidos internos do choque mecânico e da fricção. Para além do gravitropismo, a coifa determina a direção do crescimento radicular com base na necessidade e disponibilidade de recursos no solo, como a aquisição de água e de nutrientes, a formação de agregados de partículas do solo, o prisionamento de metais pesados, a interação com microrganismos ou a esquiva de regiões mais salinizadas (GANESH et al., 2022).

A coifa é composta por uma columela central, células laterais adjacentes e células secretoras de mucilagem, também chamadas células de fronteira, que periodicamente se destacam do tecido (BARLOW, 2002). Em um estudo recente, BERHIN et al. (2019) descreveu ainda uma cutícula efêmera, que media os primeiros momentos do contato da coifa com o solo, e permite o brotamento de raízes laterais sem adesão ou colapso de células internas do eixo. As células de fronteira, por sua vez, integram o sistema de defesa da coifa, sendo capazes de identificar sinais de microrganismos patogênicos e reagir fortalecendo as paredes

celulares vizinhas e liberando espécies reativas de oxigênio (PLANCOT et al., 2013).

Quem completa esse sistema de defesa é a mucilagem que a coifa secreta, que, ao mesmo tempo em que atrai alguns microrganismos, repele outros. Polissacarídeos, lipídeos, proteínas e água compõem majoritariamente a mucilagem (JIANG et al., 2022) de modo a criar uma matriz aquosa com os agregados próximos, proporcionando a formação de um ambiente úmido e rico, propício à proliferação microbiana (NAZARI et al., 2020). Microrganismos endofíticos atraídos para essa região podem explorar o espaço entre a epiderme e a coifa para penetrar na raiz (BARBOSA et al., 2015). Simultaneamente a esse movimento de atração, a coifa seleciona microrganismos potencialmente patogênicos para rejeitá-los por meio da emissão de enzimas e peptídeos antimicrobianos (DRIOUCH et al., 2021), de DNA extracelular e histonas, que, segundo JIANG et al. (2022), coíbem a germinação de esporos microbianos e o crescimento micelial, bem como de flavonoides e estrigolactonas.

Na extremidade superior do eixo radicular, outras portas de entrada são geradas e aproveitadas por patógenos ou por microrganismos benéficos para colonizar o endófito. As feridas abertas durante a emissão das raízes laterais criam um portão, utilizado por microrganismos como *Burkholderia* sp. (COMPANT et al., 2005), que é rapidamente selado. Doravante, sabe-se também do uso de pêlos radiculares para esse acesso, por bactérias como *Rhizobium* sp., para alcançar o interior das raízes de leguminosas (MERCADO-BLANCO et al., 2012) e por *Azoarcus* sp. em gramíneas (HUREK et al., 1994).

Semelhanças estruturais entre os polos radiculares podem levar a crer que esses ambientes são iguais, gerando confusão, e, nesse momento, a biologia molecular surge como uma ferramenta capaz de explicitar o contraste real que existe. Ainda que as raízes laterais também apresentem uma coifa seguida de uma zona de alongamento, essas não têm o mesmo destino. A expansão horizontal das raízes confronta um limite letal: para regular sua arquitetura e impedir o crescimento contínuo, as células da coifa são induzidas à apoptose (MÖLLER; XUAN & BEECKMAN, 2017). Essa resposta ao limite de crescimento é mediada pela expressão de genes ANAC033/SOMBRERO (FENDRYCH et al., 2014) e, segundo

XUAN et al. (2016), pode ocorrer de forma síncrona, coordenando a extensão e a organização distal das raízes laterais, pondo fim aos benefícios conferidos pela coifa. Assim, os polos radiculares contam com mecanismos capazes de atrair microrganismos distintos, estruturando suas próprias comunidades.

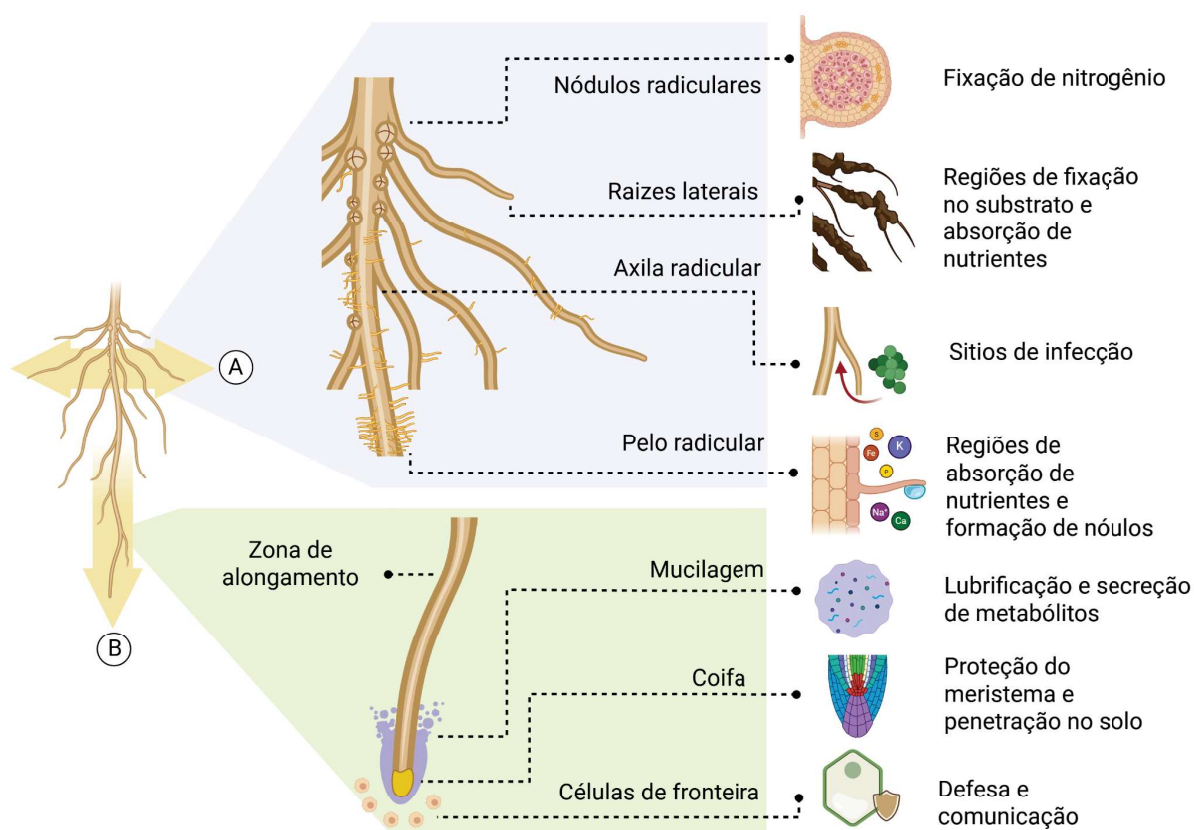


Figura 2. A ilustração representa dois compartimentos distintos (A e B) que surgem a partir de uma raiz completa e madura (C), em função das diferentes atividades desenvolvidas pela raiz e dos nichos que se formam a partir delas. (Fonte: Autoria própria, elaborado no Biorender.com).

2.4. Interações microbianas

O solo, então, fornece a matéria-prima para o microbioma vegetal — sua microbiota —; simultaneamente, a raiz atua como força motriz no recrutamento desses indivíduos. Entretanto, o processo de colonização e o estabelecimento de uma comunidade em um determinado habitat não dependem apenas desses filtros, mas também de interações e conexões entre os microrganismos. Esse bem-estar social microbiano será peça-chave para o sucesso de tecnologias de bioinoculantes

e bioinsumos, para que diferentes micro-organismos possam compor o mesmo inóculo (FIGUEIREDO et al., 2017) e para que micro-organismos introjetados no solo não sejam sabotados ou suprimidos pela microbiota nativa (MAWARDA et al., 2022).

Em ambientes densamente colonizados e repletos de nutrientes e minerais, como a rizosfera, interações inibitórias e competitivas são comuns e centrais na formação de comunidades microbianas (ROBERT & CHENU). À medida que um grupo capta mais recursos como água, nutrientes, matéria orgânica e espaço, a competição se estende e grupos mais eficientes ou adaptados dominam o meio, excluindo táxons concorrentes (GUI et al., 2017). O interesse de grupos distintos por substâncias distintas pode ser um alívio nesses momentos. Segundo WANG & KUZUYAKOV (2024). Bactérias são mais eficientes no uso de compostos orgânicos simples, enquanto os fungos optam por compostos complexos e recalcitrantes, ainda que compitam por compostos intermediários.

Ainda que a competição predomine nas interações microbianas, relações cooperativas podem emergir como resposta às pressões ambientais, especialmente quando há interdependência metabólica entre os parceiros (FRITTS, MCCULLY & MCKINLAY, 2021). Um grande exemplo é a alimentação cruzada (*cross-feeding*), que constitui uma interação em que os produtos do metabolismo de um microrganismo são utilizados como substrato por outro, promovendo conexões funcionais na comunidade (SMITH et al., 2019). Evidências indicam que essas interações são facilmente estabelecidas e influenciadas positivamente pela distância metabólica e filogenética entre os parceiros, sugerindo que diferenças funcionais ampliam o potencial de complementaridade (GIRI et al., 2021). Além do compartilhamento de nutrientes, a alimentação cruzada pode contribuir para a detoxificação do ambiente, quando metabólitos potencialmente tóxicos produzidos por um organismo são consumidos por outro, limpando o microambiente e protegendo a comunidade (GOLDSCHMIDT & REGOES, 2018).

Comunicação e troca de informações são essenciais para a formação de uma comunidade a partir de seus indivíduos, e no meio microbiano essas relações podem ser mediadas por sinais químicos e moléculas dispersas no meio, como o fenômeno chamado de *quorum sensing* (FUQUA, WINANS & GREENBERG, 1994),

através do qual bactérias são capazes de perceber alterações na sua densidade populacional e gerenciá-la através da produção de autoindutores como lactonas e oligopeptídeos que influenciam suas taxas de expressão gênica (MILLER & BASSLER, 2001), podendo assim, modificar fatores como nível de virulência, reprodução, resistência, ou mesmo abundância e composição de comunidades (LIANG et al., 2020). No entanto, há também bactérias e fungos capazes de degradar esses sinais por meio de enzimas lactonases (MOLINA et al., 2003; UROZ & HEINONSALO, 2008), ou ainda aqueles capazes de produzir inibidores do *quorum sensing* (DE OLIVEIRA & DE SAENZ, 2023), efetuando um controle biológico natural, e consequentemente a manutenção da comunidade.

Outro mecanismo de grande relevância para estabelecer uma comunidade microbiana é a formação de biofilme microbiano: uma matriz polimérica extracelular capaz de conferir resistência, mitigar o estresse hídrico de comunidades microbianas e servir como um meio de emissão de sinais contra antagonistas e patógenos (SAXENA et al., 2019). Para além da capacidade de abrigar múltiplas espécies, biofilmes podem formar-se em cooperação, o que confere maior estabilidade estrutural e funcional às comunidades microbianas (SUN et al., 2020). Evidências recentes indicam que a formação de biofilmes multiespécies beneficia mais da diversidade funcional do que da riqueza taxonômica, uma vez que comunidades diversas aumentam a probabilidade de incluir espécies-chave capazes de organizar o processo de colonização (XIONG et al., 2021). Nesse cenário, determinadas bactérias com potencial para promover o crescimento vegetal, porém com baixa eficiência de colonização —como *Paenibacillus amylolyticus* —, se beneficiam de interações em biofilmes multiespécies, impactando as funções da comunidade (YANG et al. 2024).

Mas além disso, biofilmes são centrais no processo de transferência horizontal de genes (WU et al., 2021), e essa transmissão de informações e instruções é feita por outra peça-chave da comunicação bacteriana, os plasmídeos, fragmentos de DNA circular móveis e individualizados do cromossomo (SMILLIE et al., 2010). Plasmídeos podem ser transferidos pelo contato entre células, dispersos no meio extracelular, ou mesmo transferidos por bacteriófagos (BANU & PRASAD 2017), e as principais funcionalidades atribuídas a esses fragmentos são sua capacidade de

transmitir genes que conferem capacidade de biorremediação de compostos do solo e de resistência a moléculas antibióticas (BANU & PRASAD 2017; VARNET et al., 2022; WU et al., 2022). Isso insere essa ferramenta de DNA extracromossômico como peça fundamental para o vigor e a resistência das comunidades microbianas.

As interações entre domínios também contribuem para a formação do microbioma. diversos trabalhos mostram que Bactérias podem se aderir a hifas fúngicas aumentando a eficiência de sua dispersão no solo, sendo capaz inclusive de conectar compartimentos (WARMINK et al., 2011;). No entanto essa mesma capacidade de aderência pode ser utilizada para interações de predação ou competição, como apresentado por HOVER et al., 2016, que demonstrou a capacidade de *S. marcescens* de se aderir e migrar por hifas de zigomicetos e basidiomicetos, e provocar a morte do micélio.

A produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) é outro meio pelo qual se estabelece essa interação. Compostos orgânicos voláteis são moléculas que apresentam um esqueleto carbônico e são voláteis à temperatura ambiente (CICOLELLA, 2008). Essas moléculas são emitidas e percebidas por indivíduos filogeneticamente relacionados, ou mesmo de reinos diferentes, como bactérias, fungos, plantas e animais (WEISSKOPF, SCHULZ, & GARBEVA, 2021), e a produção desses compostos está relacionada a uma gama de funções, dentre elas a resistência a estresses abióticos e o biocontrole de patógenos (RAZO-BELMAN & OZUNA, 2021), e à promoção do crescimento vegetal por microrganismos (RUSSO et al., 2022). Desse modo, os VOCs também participam da trama de comunicação e de sinalização do microbioma. Bactérias são capazes de detectar, interpretar e responder a estímulos provocados por VOCs fúngicos que influenciam a sua motilidade (SCHMIDT et al., 2016). No sentido oposto, bactérias também podem beneficiar fungos por meio da liberação de VOCs que promovem o crescimento micelial (ORBAN et al., 2022).

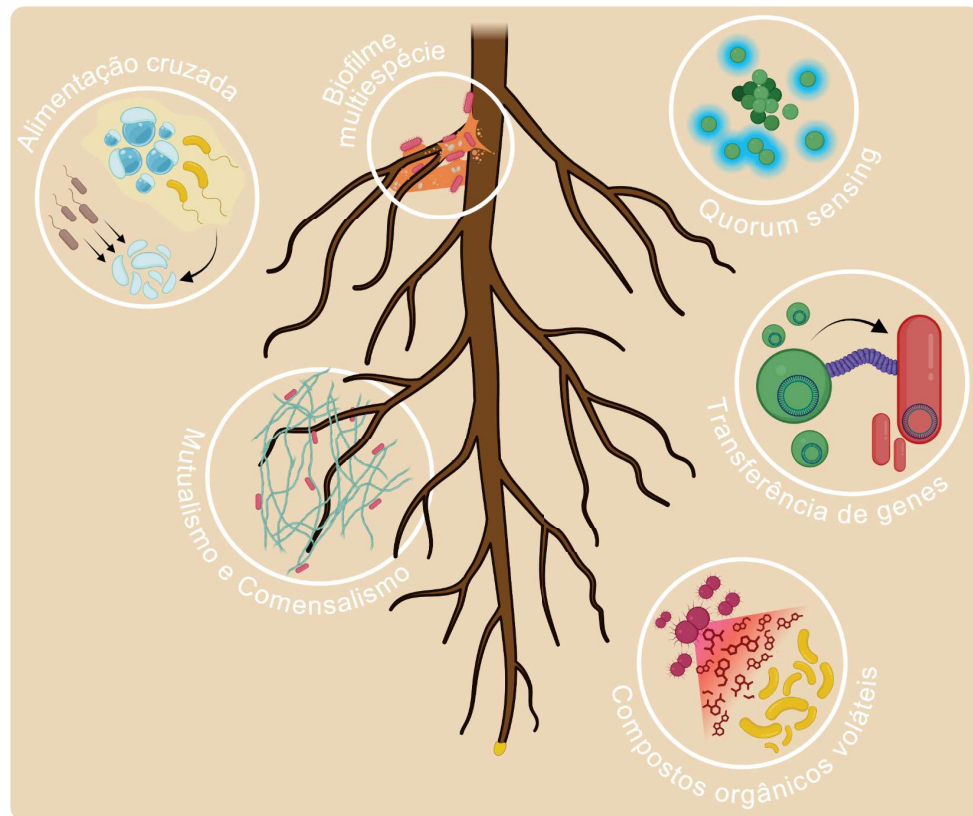


Figura 3. Interações ecológicas não-antagônicas e formas de comunicação entre fungos e bactérias do solo, capazes de beneficiar um ou ambos indivíduos: Alimentação cruzada, biofilme multiespécie, Quorum sensing, Transferência horizontal de genes, relações de mutualismo e comensalismo entre bactérias e hifas fúngicas, e a produção de compostos voláteis.

A complexidade que reside na composição e nas interações entre comunidades microbianas do solo, bem como no relacionamento dessas comunidades com o espaço e os recursos à sua volta, oferece um ambiente fértil para estudos mais modernos e abrangentes sobre o microbioma vegetal, capaz de permitir que as predições sobre fisiologia e promoção do crescimento vegetal sejam mais precisas e acuradas. Diante desse cenário, essa revisão destaca detalhes da formação de um microbioma que acabam por compartimentá-lo, gerando *hotspots* de colonização microbiana.

Bibliografia

ADAMOWSKI, Maciek; FRIML, Jiří. PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. **The Plant Cell**, v. 27, n. 1, p. 20-32, 2015.

BABA, Abu Imran et al. Plants in microgravity: molecular and technological perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 18, p. 10548, 2022.

BAND, Leah R. et al. Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 12, p. 4668-4673, 2012.

BANU, Husne; PRASAD, Kurcheti Pani. Role of plasmids in microbiology. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 8, n. 01, 2017.

BARBOSA, Julierme Zimmer et al. Bactérias e fungos benéficos na endosfera das plantas. **Revista Agrogeoambiental**, v. 7, n. 3, 2015.

BARLOW, Peter W. The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 4, p. 261-286, 2002.

BARROS, Pedro M. et al. 6 The Root Periderm. **Plant Roots: The Hidden Half**, p. 104, 2024.

BEAULIEU, Carole et al. Physical, chemical and proteomic evidence of potato suberin degradation by the plant pathogenic bacterium *Streptomyces scabiei*. **Microbes and environments**, v. 31, n. 4, p. 427-434, 2016.

BERG, Gabriele et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, p. 1-22, 2020.

BHATTARAI, Archana; BHATTARAI, Bishwoyog; PANDEY, Sunil. Variation of soil microbial population in different soil horizons. **J Microbiol Exp**, v. 2, n. 2, p. 00044, 2015.

BLANCAFLOR. **Plant Gravitropism**. Humana Press, 2015.

BOROWIK, A.; WYSZKOWSKA, J. Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. 2016.

BRIDGES, E. M. Soil horizon designations; past use and future prospects. **Catena**, v. 20, n. 4, p. 363-373, 1993.

CAPUANI, Silvia et al. Atividade microbiana em solos, influenciada por resíduos de algodão e torta de mamona. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 1269-1274, 2012.

CHEN, Anle et al. Plant root suberin: a layer of defence against biotic and abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1056008, 2022.

CICOLELLA, A. Volatile Organic Compounds (VOC): definition, classification and properties. **Revue des maladies respiratoires**, v. 25, n. 2, p. 155-163, 2008.

COMPANT, Stéphane et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1685-1693, 2005.

DA GLÓRIA, Beatriz Appezzato; GUERREIRO, CSM. **Anatomia vegetal**. Universidade de São Paulo. ESALQ, 1992.

DE OLIVEIRA, Vinícius Freitas; DE SAENZ, Charlotte Cesty Borda. Fatores inibitórios do Quorum sensing e sua relação com o biofilme. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, v. 11, n. 4, 2023.

DE SILVA, Nayana DG et al. Root suberin plays important roles in reducing water loss and sodium uptake in *Arabidopsis thaliana*. **Metabolites**, v. 11, n. 11, p. 735, 2021.

DOTANIYA, M. L.; MEENA, V. D. Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants: a review. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, p. 1-12, 2015.

DRIOUICH, Azeddine et al. Root cap—derived cells and mucilage: a protective network at the root — **Protoplasma**, v. 258, n. 6, p. 1179-1185, 2021.

FENDRYCH, Matyáš et al. Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 24, n. 9, p. 931-940, 2014.

FIGUEIREDO, Guilherme Grodzki Oliveira et al. Interaction between beneficial bacteria and sugarcane. In: **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 1-27.

FRITTS, Ryan K.; MCCULLY, Alexandra L.; MCKINLAY, James B. Extracellular metabolism sets the table for microbial cross-feeding. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 85, n. 1, p. 10.1128/mmbr. 00135-20, 2021.

FUQUA, W. Claiborne; WINANS, Stephen C.; GREENBERG, E. Peter. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269-275, 1994.

FUSCONI, Anna. Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: what role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation?. **Annals of Botany**, v. 113, n. 1, p. 19-33, 2014.

GANESH, Alagarasan et al. Root cap to soil interface: a driving force toward plant adaptation and development. **Plant and Cell Physiology**, v. 63, n. 8, p. 1038-1051, 2022.

GERKE, Jörg. The central role of soil organic matter in soil fertility and carbon storage. **Soil Systems**, v. 6, n. 2, p. 33, 2022.

GIEHL, Ricardo FH; VON WIRÉN, Nicolaus. Root nutrient foraging. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 509-517, 2014.

GIRI, Samir et al. Metabolic dissimilarity determines the establishment of cross-feeding interactions in bacteria. **Current Biology**, v. 31, n. 24, p. 5547-5557. e6, 2021.

GOLDSCHMIDT, Felix; REGOES, Roland R.; JOHNSON, David R. Metabolite toxicity slows local diversity loss during expansion of a microbial cross-feeding community. **The ISME journal**, v. 12, n. 1, p. 136-144, 2018.

GÖMÖRYOVÁ, Erika et al. Responses of soil microorganisms and water content in forest floor horizons to environmental factors. **European Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 71-76, 2013.

GUI, Heng et al. Arbuscular mycorrhiza enhance the rate of litter decomposition while inhibiting soil microbial community development. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42184, 2017.

GUPPY, Chris N. et al. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. **Soil Research**, v. 43, n. 2, p. 189-202, 2005.

HASSAN, Mohammad K.; MCINROY, John A.; KLOEPPER, Joseph W. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. **Agriculture**, v. 9, n. 7, p. 142, 2019.

HUREK, Thomas et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 7, p. 1913-1923, 1994.

JIANG, Yutong et al. Root mucilage: Chemistry and functions in soil. **Encyclopedia of Soils in the Environment**, v. 1, p. 332-42, 2023.

KOLATTUKUDY, PE t. Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. **Annual Review Plant Physiology**, v. 32, n. 1, p. 539-567, 1981.

KUPPE, Christian W. et al. Rhizosphere models: their concepts and application to plant-soil ecosystems. **Plant and Soil**, v. 474, n. 1, p. 17-55, 2022.

LEHMANN, Johannes; KLEBER, Markus. The contentious nature of soil organic matter. **Nature**, v. 528, n. 7580, p. 60-68, 2015.

LIANG, Xiaolong et al. Quorum-sensing signals alter in vitro soil virus abundance and bacterial community composition. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1287, 2020.

LYNCH, Jonathan P. Harnessing root architecture to address global challenges. **The Plant Journal**, v. 109, n. 2, p. 415-431, 2022.

MARTINS, Isabel et al. Elucidating how the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans* uses the plant polyester suberin as carbon source. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-19, 2014.

MAGDOFF, Fred et al. **Building soils for better crops**. Beltsville: Sustainable Agriculture Network, 2000.

MERCADO-BLANCO, Jesús; PRIETO, Pilar. Bacterial endophytes and root hairs. **Plant and Soil**, v. 361, n. 1, p. 301-306, 2012.

MILLER, Melissa B.; BASSLER, Bonnie L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165-199, 2001.

MOLINA, Lázaro et al. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 71-81, 2003.

MUNSIRI, Prasert; BOYD, Claude E.; HAJEK, Ben F. Physical and chemical characteristics of bottom soil profiles in ponds at Auburn, Alabama, USA and a proposed system for describing pond soil horizons. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 26, n. 4, p. 346-377, 1995.

NA, D. I. N. G. et al. Interaction mechanism between root secretion and rhizosphere microorganisms: A review. **Chinese Journal of Soil Science**, v. 53, n. 5, p. 1212-1219, 2022.

NAZARI, Meisam et al. Mucilage polysaccharide composition and exudation in maize from contrasting climatic regions. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 587610, 2020.

ORBAN, Axel et al. Effect of bacterial volatiles on the mycelial growth of mushrooms. **Microbiological Research**, v. 266, p. 127250, 2023.

PADILLA-REYNAUD, Rebeca et al. Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 3, p. 245-253, 2015.

PAVINATO, Paulo Sérgio; ROSOLEM, Ciro Antonio. Disponibilidade de nutrientes no solo: decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 911-920, 2008.

RAUBUCH, Markus; BEESE, Friedrich. Influence of soil acidity on depth gradients of microbial biomass in beech forest soils. **European Journal of Forest Research**, v. 124, n. 2, p. 87-93, 2005.

RAZO-BELMAN, Rosario; OZUNA, César. Volatile organic compounds: A review of their current applications as pest biocontrol and disease management. **Horticulturae**, v. 9, n. 4, p. 441, 2023.

ROBERT, Michel; CHENU, Claire. Interactions between soil minerals and microorganisms. In: **Soil Biochemistry**. CRC Press, 2021. p. 307-404.

REGELINK, Inge C. et al. Linkages between aggregate formation, porosity and soil chemical properties. **Geoderma**, v. 247, p. 24-37, 2015.

RICE, Charles W. Organic matter and nutrient dynamics. **Encyclopedia of soil science**, v. 2, p. 1180-1183, 2002.

ROYCHOUDHRY, Suruchi et al. The developmental and environmental regulation of gravitropic setpoint angle in *Arabidopsis* and bean. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42664, 2017.

SILVA, Carlos Alberto et al. Matéria orgânica do solo: ciclo, compartimentos e funções. **Entendendo a matéria orgânica do solo em ambientes tropical e subtropical**, p. 17-48, 2023.

SINGH, Harshita et al. Lateral root branching: evolutionary innovations and mechanistic divergence in land plants. **New Phytologist**, v. 238, n. 4, p. 1379-1385, 2023.

SCHMIDT, Ruth et al. Microbial small talk: volatiles in fungal–bacterial interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1495, 2016.

SMILLIE, Chris et al. Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 434-452, 2010.

SMITH, Nick W. et al. The classification and evolution of bacterial cross-feeding. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 153, 2019.

SU, Shih-Heng et al. Molecular mechanisms of root gravitropism. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. R964-R972, 2017.

SU, Yu et al. The evolutionary innovation of root suberin lamellae contributed to the rise of seed plants. **Nature Plants**, v. 9, n. 12, p. 1968-1977, 2023.

SUN, Xiaojie et al. Interspecific interactions in dual-species biofilms of soil bacteria: effects of fertilization practices. **Journal of Soils and Sediments**, v. 20, n. 3, p. 1494-1501, 2020.

TANG, Lili; WANG, Shengqiang. Dynamics of soil aggregate-related C-N-P stoichiometric characteristics with stand age and soil depth in Chinese fir plantations. **Land Degradation & Development**, v. 33, n. 8, p. 1290-1306, 2022.

UROZ, Stephane; HEINONSALO, Jussi. Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signal molecules by forest root-associated fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 2, p. 271-278, 2008.

VARNER, Paige M. et al. The effect of bacterial growth strategies on plasmid transfer and naphthalene degradation for bioremediation. **Environmental Technology & innovation**, v. 28, p. 102910, 2022.

VENTURI, Vittorio; KEEL, Christoph. Signaling in the rhizosphere. **Trends in plant science**, v. 21, n. 3, p. 187-198, 2016.

WANG, Chaoqun; KUZYAKOV, Yakov. Mechanisms and implications of bacterial–fungal competition for soil resources. **The ISME Journal**, v. 18, n. 1, p. wrae073, 2024.

WANG, Cheng-yu et al. Soil pH is the primary factor driving the distribution and function of microorganisms in farmland soils in northeastern China. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 13, p. 1461-1473, 2019.

WARMINK, J. A. et al. Hitchhikers on the fungal highway: the helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 760-765, 2011.

WEISSKOPF, Laure; SCHULZ, Stefan; GARBEVA, Paolina. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 391-404, 2021.

WU, Shan et al. An invisible workforce in soil: The neglected role of soil biofilms in conjugative transfer of antibiotic resistance genes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 15, p. 2720-2748, 2022.

XIONG, Xiang et al. Keystone species determine the “selection mechanism” of multispecies biofilms for bacteria from soil aggregates. **Science of the Total Environment**, v. 773, p. 145069, 2021.

XUAN, Wei et al. Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in Arabidopsis. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 384-387, 2016.

YANG, Nan et al. Interspecific interactions facilitate keystone species in a multispecies biofilm that promotes plant growth. **The ISME Journal**, v. 18, n. 1, p. wrae012, 2024.

3. Revisão em Bancos de Propriedade Intelectual

Esta seção visa compreender como os principais assuntos tratados neste trabalho alcançam o mercado de ciência e tecnologia, sob a forma de aplicações inovadoras, e, para tal, este tópico revisa a inserção de temas centrais deste trabalho no cenário da produção de patentes. A revisão foi realizada com base nos dados fornecidos pela plataforma *lens.org*. Tendo em vista o tema deste projeto, a busca foi realizada a partir dos termos “Metabarcoding AND Root microbiome” e

“Rhizosphere metabarcoding”, que não produziram resultados. Em seguida, realizou-se a busca pelo termo “*Root Microbiome*” e as patentes foram filtradas para que o termo estivesse presente no título, no resumo e nas reivindicações. Com isso, o banco apresentou 104 patentes e o grupo das “famílias simples” apresentou 68 resultados. Após nova filtração para remover patentes relacionadas a áreas divergentes, como saúde humana e odontologia, restaram 31 registros (Figura 3). As patentes encontradas nesta pesquisa tiveram início de depósito em 2016 e 4 estão ativas.

A partir disso, foram elaborados portfólios que contam com as classes de patentes observadas pelo CPC (Classificação Cooperativa de Patentes) e com grupos nos quais foi possível alocar empresas e universidades com serviços semelhantes desenvolvidos. A maioria das patentes observadas concentra-se em biocidas e agentes biológicos para proteção de plantas - A01N63/ (biocidas/reguladores de crescimento de origem microbiana, 23 ocorrências), C12N1/ (microrganismos e meios/cultivo, 22) e C12Q1/ (métodos de análise/diagnóstico envolvendo enzimas, DNA ou microrganismos, 19). Também aparecem com frequência relevantes classificações relacionadas à formulação de fertilizantes, ao biocontrole, à indexação taxonômica de microrganismos. Outras classes são raras na amostra avaliada, como máquinas de colheita e produtos de uso terapêutico.

Referente à essa pesquisa, dentre as patentes lidas e empresas que as empregam, algumas se destacaram, mencionadas à seguir: A empresa Biome Makers Inc., fundada em 2015 no vale do silício, e citada na sessão de isolamento e identificação de isolados e microbiomas, realiza trabalhos que envolvem, entre outras atividades, a análise de características do solo, de modo a influenciar positivamente a tomada de decisões do ramo agrícola; Dentre essas características, está a caracterização e isolamento da microbiota. Procedimentos semelhantes são identificados nas atividades da *startup* japonesa Sunlit Seedlings, fundada em 2020 na Universidade de Quioto. A produtora de fertilizantes russa EUROCHEM, por sua vez, situada na aba de inoculação e promoção do crescimento vegetal, conta com produtos e serviços voltados ao uso de micro-organismos capazes de melhorar a eficiência do P para as plantas.

MAPEAMENTO DE PATENTES



Figura 3. Mapeamento dos desenvolvedores de patentes oriundas da pesquisa (filtrada) por “Root microbiome”, organizado em classes de produtos e serviços, com base em suas respectivas patentes. (Fonte: Autoria própria, elaborado no Canva.com).

Em uma nova rodada de buscas, foram utilizados, em conjunto, os termos “Glycine max AND Root AND Bacteria”, considerando a espécie vegetal de interesse deste trabalho. O mesmo processo de filtragem de patentes foi realizado e, ao final, 15 delas foram selecionadas para integrar este trabalho (Figura 4). A análise dessa segunda amostra de patentes revelou predominância de classificações relacionadas à biotecnologia e à proteção de plantas, com destaque para C12N15/ (engenharia genética e construções de DNA/RNA), A01N63/ (biocidas e reguladores de crescimento de origem microbiana) e C12Q2600/ (ensaios moleculares específicos). Além desses, os demais abrangiam temas como cultura de tecidos, biocidas, cultivo de micro-organismos, reguladores do crescimento vegetal, diagnósticos moleculares e aplicações voltadas à adaptação e mitigação climáticas. As patentes encontradas nesta pesquisa tiveram início de depósito em 2000 e 4 estão ativas.

Referente a essa segunda rodada de pesquisa, a Universidade Johns Hopkins desenvolveu um método para isolar microrganismos endofíticos, modificar seu conteúdo genético por meio de conjugação com outros microrganismos selecionados e reintroduzir os isolados em plantas para promover o crescimento vegetal. Além desta, a Purdue Research Foundation, fundada em 1930 em Indiana, fez o depósito de uma patente que abrangia a produção de plantas ou células vegetais recombinantes, capazes de produzir um pequeno RNA que regula negativamente genes reguladores da nodulação em soja, de modo que, quando inoculada com microrganismos fixadores de nitrogênio, a planta produziria mais nódulos.

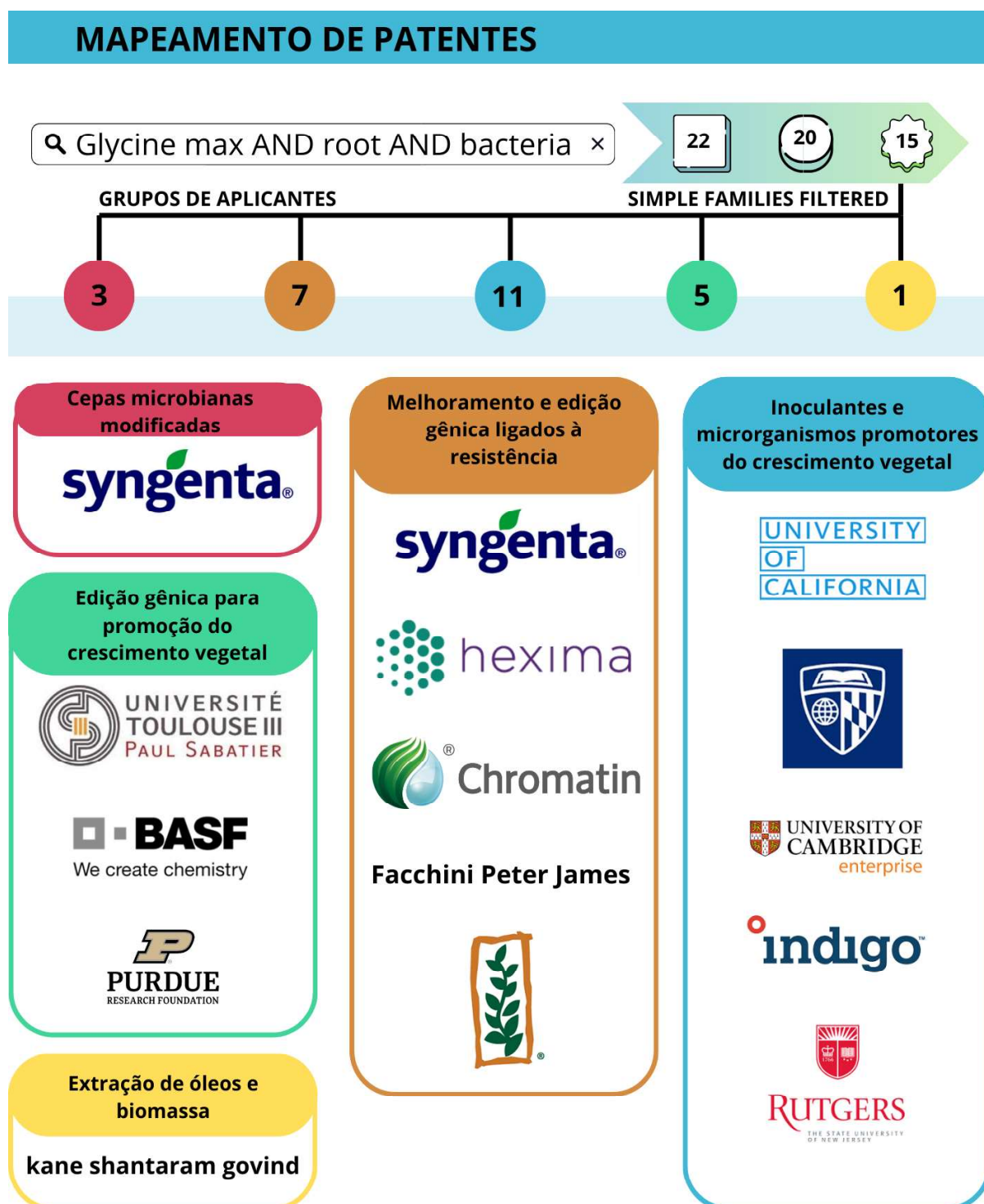


Figura 4. Mapeamento dos desenvolvedores de patentes oriundas da pesquisa (filtrada) por “*Glycine max AND Root AND Bacteria*”, reunidos em classes referentes aos produtos e serviços entregues a partir de suas respectivas patentes. (Fonte: Autoria própria, elaborado no Canva.com).

Dentre os 46 aplicantes e proprietários, 12 são universidades, enquanto as demais são empresas consolidadas, *startups* ou pesquisadores.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo compreender a distribuição de microrganismos do solo entre diferentes compartimentos radiculares e rizosféricos de plântulas de soja, bem como caracterizar a formação e estrutura dessas regiões e também inferir sobre a atividade microbiana das comunidades de cada compartimento, em termos qualitativos e quantitativos.

4.2. Objetivos específicos

- Relatar a localização de bactérias e fungos no solo, nos solos rizosféricos e nos tecidos radiculares (das regiões de coifa-alongamento, da zona de ramificação e da radícula de plântulas de soja), contrastando sua presença e abundância.
- Mensurar a atividade e caracterizar os traços metabólicos das comunidades microbianas nos diferentes compartimentos do sistema solo-planta.
- Determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) nos diferentes compartimentos do solo e da raiz, bem como estimar o número mais provável de microrganismos diazotróficos (NMP/g).
- Isolar e classificar microrganismos oriundos das comunidades de cada compartimento a partir de uma caracterização funcional que os encaminhe para testes de promoção do crescimento vegetal.
- Caracterizar a topografia e histoquímica dos compartimentos radiculares por meio de técnicas de microscopia

- Inferir a influência vegetal na formação e na estruturação destes compartimentos a partir do perfil de genes diferencialmente expressos nos polos radiculares.

5. Materiais e Métodos

5.1 Material vegetal

O ensaio foi conduzido em uma casa de vegetação, com iluminação natural e temperatura de 30 ± 2 °C, localizada na UENF, no município de Campos dos Goytacazes – RJ. Em delineamento inteiramente casualizado, 100 vasos de 700 dm³ foram preenchidos com substrato Basaplant® Hortaliças (Tabela 1), nos quais foram plantadas 3 sementes de soja da variedade comercial BRS-533. Com 5 dias de crescimento, foi feito desbaste, ficando 1 planta por vaso, até atingir 10 dias (Fase de emissão do primeiro trifólio). Passado este período, as plantas foram cuidadosamente removidas do substrato para que os compartimentos fossem coletados, tratados aqui como tratamentos de raiz e de substrato (Quadro 1).

Quadro 1. Regiões de tratamento, inseridas como compartimentos no trabalho, acrescidas das siglas que as identificam.

Tratamentos analisados	
Compartimentos	Siglas
Raiz completa	RC
Tecido radicular da coifa-zona de alongamento	RT1
Tecido radicular da zona de ramificação-pilífera	RT2
Solo rizosférico da região da coifa-zona de alongamento	SR1
Solo rizosférico da região da zona de ramificação-pilífera	SR2
Radícula geminada in vitro	RT0
Solo-à-granel	BS

Para discernir com precisão o limite entre a zona de alongamento e a zona de ramificação (RT1 e RT2), uma raiz de plântula de soja plantada anteriormente e colhida 10 dias depois foi lavada em água corrente para remoção de partículas do

substrato e observada com lupa. Permitindo delimitar com maior precisão as regiões da coifa da raiz principal e a zona de ramificação. Devido ao pequeno volume de amostras em alguns compartimentos, adotou-se o modelo de amostra composta.

O primeiro compartimento a ser coletado foi o solo-à-granel (BS), para tal, com o uso de uma espátula foram coletadas de várias plantas, amostras de solo sem contato com as raízes. Em seguida, a planta, junto ao torrão de substrato, foi cuidadosamente destacada do vaso, expondo a coifa aparente no fundo deste. Então, com uma lâmina, foi possível seccionar a coifa (RT1) com a rizosfera aderida (SR1). Para destacar as partículas de substrato aderidas na coifa, foi feita a agitação manual do tecido em um tubo eppendorf estéril, e por vezes, utilizado um pincel. A coleta dos compartimentos superiores em relação ao eixo radicular foi realizada em seguida. Com as regiões RT1/SR1 removidas, foi retirado o excesso de solo do torrão, e a rizosfera da zona de ramificação (SR2) foi separada da raiz (RT2) por agitação manual e também com o uso de pincel, sobre uma placa de Petri estéril.

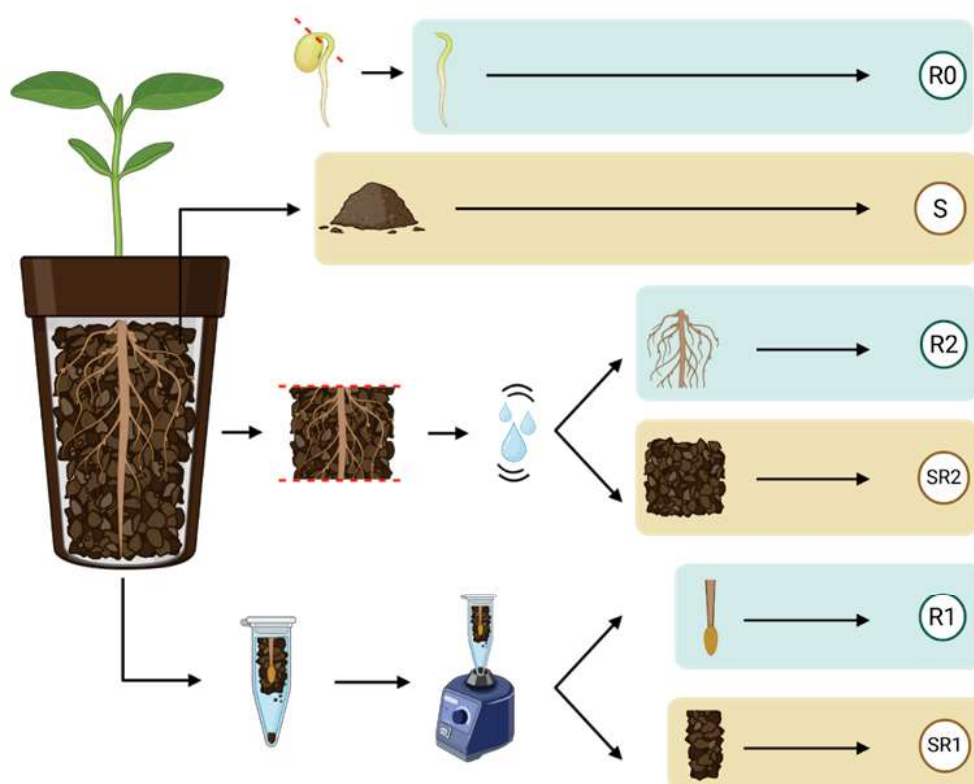


Figura 5. Esquema ilustrativo da origem de cada compartimento do sistema completo (planta dentro do vaso, à esquerda) e da forma de coleta de cada compartimento considerado como tratamento neste trabalho (à direita). (Fonte: Autoria própria, elaborado no Biorender.com).

Para analisar os parâmetros da radícula (RT0), 40 sementes foram dispostas entre 3 folhas de papel Germitest®, enroladas e inseridas em um Becker. No Becker, foi adicionado um volume de água estéril equivalente a 3 vezes o peso total do papel. O béquer com os rolos foi armazenado em uma incubadora BOD a 27 °C por 3 dias. Passado esse tempo, as radículas emitidas foram seccionadas com auxílio de uma lâmina estéril.

Tabela 1. Composição nutricional do substrato, expressa em g/kg, bem como propriedades físico-químicas, como pH e umidade. P (Fósforo); K (Potássio); Ca (Cálcio); Mg (Magnésio); C (Carbono); S (Enxofre); Fe (Ferro); Cu (Cobre); Zn (Zinco); Mn (Manganês), B (Boro); U (Umidade).

Composição do substrato: propriedades físico-químicas	
Característica	Substrato
pH	4,9
N (g/kg)	5,04
P (g/kg)	3,77
K (g/kg)	2,1
Ca (g/kg)	5,2
Mg (g/kg)	0,4
C (g/kg)	249,6
S (g/kg)	0,54
Fe (mg/kg)	8855
Cu (mg/kg)	26
Zn (mg/kg)	90
Mn (mg/kg)	182
B (mg/kg)	104,8
U (%)	30,64

5.2 Estimação da fração culturável de microrganismos de solo e raiz

Os procedimentos de cultivo e de estimaco de comunidades descritos a seguir foram realizados conforme DBEREINER, BALDANI & BALDANI (1995). E os meios de cultura utilizados constam no Quadro 2.

Contagem total: Após a coleta e o processamento dos compartimentos (descritos na seo de coleta), 1 g de cada compartimento foi pesado, imerso em 9 mL de soluo salina, macerado e, ento, diludo em série até 10^{-7} . Em seguida, de 10^{-2} a 10^{-4} , 100 μ L de cada diluo foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NB. As placas foram ento incubadas a 30 °C por 48 h.

Número mais provvel de diazotróficos: Para estimar o número mais provvel de microrganismos diazotróficos (NMP/mL) após o processamento descrito acima, as dilues de 10^{-4} a 10^{-7} foram inoculadas em dois meios de cultura semi-sólidos, JNFB e LGI e incubadas a 30 °C por 7 dias. Passado este tempo, o NMP foi estimado pela contagem de frascos com formao de pelcula aerotxica, com base na tabela de McGrady.

Contagem seletiva: Para mensurar a comunidade, com base em sua capacidade de crescer e/ou metabolizar compostos de interesse biotecnológico, as dilues de 10^{-3} foram inoculadas em placas de Petri contendo meios de cultura sólidos enriquecidos com fosfato de clcio, óxido de zinco, casena e celulose, e incubadas a 30 °C por 7 dias.

Quadro 2. Meios de cultura ou compostos principais presentes em meios mnimos de cultura, seguidos dos grupos microbianos-alvo de cada um deles, bem como suas referências bibliogrficas.

Meios de cultura utilizados para contagem e determinao do NMP		
Meio de cultura/Base	Microrganismos-alvo	Origem/Adaptao
Nutrient Broth (NB)	Generalistas	BALDANI et al., 2014
Fosfato de Clcio	Solubilizadores de fosfato	BERRAQUERO et al., 1976
xido de Zinco	Solubilizadores de óxido de zinco	BERRAQUERO et al., 1976
Protena	Proteolticos	SHARMA et al., 2015
Celulose	Celuloltica	KHATIWADA et al., 2016
JNFB	Diazotrficos	BALDANI et al., 2014
LGI	Diazotrficos	BALDANI et al., 2014

5.3 Atividade microbiana

A atividade enzimática mensurada pelo método de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), feita no solo e nos tecidos vegetais, é uma forma indireta de mensurar a atividade microbiana em diferentes amostras de forma comparativa. Para tal, utilizaram-se 0,5 g de amostra de cada um dos compartimentos; os compostos por tecidos radiculares foram macerados após a pesagem. Em seguida, as amostras foram adicionadas a tubos contendo 6 mL de tampão fosfato 0,05 M e 120 µL de diacetato de fluoresceína diluído em acetona (1 g/L). Os tubos foram então incubados em shaker rotatório por 1 h a 30 °C e 160 RPM, abrigados da luz. Em seguida, para interromper a reação e liberar o restante da fluoresceína, foram adicionados 6 mL de acetona a 50% aos tubos, que foram centrifugados por 6 minutos a 5000 RPM. Então, uma alíquota de 200 µL foi transferida para uma placa de 96 poços, e o resultado foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm (SWISHER & CARROLL, 1980). Para converter o valor de densidade óptica em fluoresceína (ng/µL), o valor branco foi subtraído dos demais, e foi considerada como base uma curva de fluoresceína montada durante o ensaio.

5.4 Microscopia de varredura

As amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) serão preparadas a partir dos segmentos de raiz. Os segmentos serão fixados imediatamente após a coleta em paraformaldeído (4%) e glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato (0,05 M, pH 6,8) por 24 horas. Em seguida, serão lavados três vezes em tampão cacodilato [0,05 M]. Dado este processo, as amostras serão desidratadas em série, em alcoóis crescentes (15, 30, 50, 70, 90 (3x) e 100% por 1 h cada) e, em seguida, completamente secas pelo ponto crítico do dióxido de carbono no Critical Point Dryer (CPD 030, BAL-TEC, Alemanha). Os segmentos então, serão organizados em suportes de alumínio, metalizados com prata ionizada e observados em microscópio eletrônico de varredura, (modelo EVO® – 40 Zeiss), de acordo com CANELLAS, 2014.

5.5 Microscopia óptica de campo claro

Para microscopia óptica de campo claro, raízes de soja foram submetidas à coloração com cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), utilizando-se uma solução de 0,1% por 2 h. Após a coloração, as raízes foram transferidas para um novo recipiente contendo solução de hidróxido de potássio (KOH) a 2,5% por 40 min, a fim de extrair o excesso de corante e permitir uma melhor observação.

Em seguida, os compartimentos RT1 e RT2 foram seccionados, montados em lâminas contendo água destilada estéril e analisados em microscópio de campo claro (Axioplan, Zeiss). A presença de microrganismos metabolicamente ativos foi inferida pela redução do TTC da forma solúvel e incolor para a forma insolúvel de cor vermelha. (SANTOS et al., 2021).

5.6 Perfil metabólico das comunidades microbianas

Para analisar o consumo de diferentes fontes de carbono pelas comunidades residentes de cada compartimento, foi utilizada a técnica de cultivo das comunidades em Ecoplacas (Biolog Ecoplates®). As Ecoplacas são placas de 96 poços, contendo 31 diferentes fontes de carbono em triplicata, nas quais são inoculadas amostras ambientais, além de 3 poços-controle, nos quais é inoculado o branco. A atividade metabólica é detectada por meio de uma mudança de cor nos poços, devido à redução do corante de tetrazólio aderido ao fundo. Para mensurar o consumo de fontes de carbono pelas comunidades, as placas são inoculadas e incubadas a 30 °C, abrigadas da luz, e, então, a cada 8 h, são submetidas à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590 nm (INSAM, 1997).

Primeiramente, foi separado e pesado 1 g das amostras coletadas em cada compartimento e foram preparados tubos com 9 mL de solução salina para a preparação de uma diluição seriada. As diluições foram plaqueadas em meio de cultura NB e incubadas por 2 dias a 30 °C, a fim de observar o ritmo de crescimento de cada uma e realizar uma contagem, para escolher a diluição a ser inoculada nas

Ecoplacas, de modo a permitir acompanhar o consumo dos substratos ao longo de 5 dias. Escolhida a diluição de 10^{-3} , as placas foram dispostas em fluxo laminar, inoculadas com 150 μ L das amostras e incubadas por 5 dias.

Para analisar os resultados, os dados foram tratados primeiro. A fim de subtrair a densidade do inóculo dos resultados, o valor mensurado no tempo 0 de cada placa foi descontado dos valores dos demais tempos (GARAU et al., 2007). Posteriormente, a média dos valores dos poços-controle foi subtraída dos valores dos demais poços.

O cálculo do desenvolvimento médio da cor dos poços (AWCD) foi realizado segundo GARLAND & MILLS (1991) e utilizou a fórmula abaixo, na qual “ci” representa a densidade média de cada poço, “R” a média dos poços-controle e “n” o número de substratos (neste caso, como o cálculo foi feito após a obtenção da média das triplicatas, $n = 31$). O mesmo princípio foi utilizado para calcular o desenvolvimento médio dos grupos de fontes de carbono (SAWCD), com a diferença de que “n” corresponde ao número de substratos de cada grupo (CHOI & DOBBS, 1999).

$$AWCD = (C_i - R) n$$

Os cálculos da diversidade de Shannon (H') e da uniformidade de Shannon (E) foram realizados conforme SOFO, MINNINI & RICCIUTI (2020). Para esses cálculos, foi escolhido o tempo de 96 h (YUAN et al., 2011), que representa o momento ótimo de consumo na maioria das placas. O primeiro mede a diversidade funcional das comunidades a partir do número de substratos que elas são capazes de metabolizar.

$$H' = - \sum p_i (\ln p_i)$$

Já o cálculo da uniformidade de Shannon (E) visa avaliar a uniformidade do consumo de fontes de carbono ao longo de um determinado período. Para tal, ele usa o resultado da diversidade (H'), dividido pelo logaritmo natural da riqueza (S). A riqueza equivale ao número de substratos com valor superior a 0,250.

$$E = H' / \ln S$$

5.7 Extração de DNA e Sequenciamento

O DNA total foi extraído a partir de 0,25 g de amostras compostas de cada compartimento, empregando o kit PowerSoil® DNA Isolation (QIAGEN, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. As amostras de raiz previamente coletadas foram lavadas e maceradas em cadinho com pistilo. Já as amostras de solo e de rizosfera foram submetidas à sonicação antes da extração e, em seguida, processadas diretamente com os reagentes do kit. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), submetida a 120 V por 35 minutos e observada sob luz ultravioleta. A quantificação do material extraído foi realizada no NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific). Para a análise do DNA bacteriano, utilizou-se a região V4 do gene 16S rRNA (primers 515F e 806R) (Tabela 2). Para o DNA fúngico, a região ITS2 (internal transcribed spacer 2) foi amplificada com os primers ITS9F e ITS4R (LUNDBERG et al., 2013). As amostras foram então submetidas ao sequenciamento na plataforma MiSeq (Illumina) pela empresa NGS Soluções Genômicas.

Tabela 2. Sequências de primers bacterianos e fúngicos utilizadas para amplificar as regiões de interesse para análise de metabarcoding, acrescidas de um número de pares de bases nas extremidades.

Primers utilizados para análise de metabarcoding		
Primers bacterianos	515-Foward	806-Reverse
Sequências	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
Primers fúngicos	ITS9-Foward	ITS4-Reverse
Sequências	GAACGCAGCRAAIIGYGA	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Após o sequenciamento, os arquivos FASTQ resultantes foram analisados no ambiente R. Inicialmente, os arquivos Fastq tiveram sua qualidade avaliada com a ferramenta FASTQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>). As sequências de

adaptadores foram removidas com o plugin Cutadapt 4.8 (MARTIN, 2011). O processamento posterior dos dados foi realizado com o pacote DADA2, seguindo o protocolo recomendado pelos autores com pequenas adaptações (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). Os parâmetros ajustados para o filtro de qualidade incluíram: truncLen = c(220, 140), maxEE = c(2, 5) e truncQ = 2, mantendo os demais valores como padrão. Após o processo de filtragem, o aprendizado das taxas de erro e a inferência das amostras, os dados de alta qualidade foram utilizados nas análises subsequentes. As leituras limpas foram demultiplexadas com base em seus códigos de barras únicos. A partir do pipeline do DADA2, foram obtidas as variantes de sequência de amplicon (ASVs), resultando em uma tabela de abundância.

As ASVs representam sequências únicas, com qualidade refinada, análogas às unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A atribuição taxonômica foi realizada utilizando o classificador bayesiano nativo do DADA2, comparando as sequências com o banco de dados Silva (versão silva_nr99_v138.1_train_set.fa.gz), adotando um critério de similaridade de 100%. As ASVs relacionadas a cloroplastos e mitocôndrias foram removidas da análise. Posteriormente, os dados foram rarefeitos e utilizados em análises de comunidades microbianas com o auxílio dos pacotes vegan, phyloseq, metacoder e microeco. Para as sequências ITS fúngicas, as ASVs foram classificadas com o recurso classify-sklearn do QIIME2 (BOKULICH et al., 2018), empregando o banco de dados UNITE 138 Ref NR 99 treinado com o classificador Naive Bayes (QUAST et al., 2012).

5.8 Extração de RNA e Sequenciamento

A extração de RNA total foi realizada apenas nos compartimentos de tecido radicular RT1 e RT2; para tal, aqueles destinados a essa análise foram lavados com água estéril em tubos Eppendorf após a coleta. Em seguida, aproximadamente 50 mg de tecido vegetal provenientes dos tratamentos foram macerados em nitrogênio líquido, utilizando gral e pistilo previamente resfriados. O RNA total foi extraído com

o reagente TRIzol® (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), conforme as instruções do fabricante.

Foram utilizadas vinte réplicas biológicas para cada tratamento, resultando em quatro réplicas independentes. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,7% (m/v), corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizada sob luz ultravioleta (UV). A qualidade e a concentração do RNA foram determinadas com o NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, EUA) e o Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, EUA). Todas as amostras apresentaram número de integridade do RNA (RIN) superior a 9,0.

A construção das bibliotecas e o sequenciamento de RNA foram realizados pela empresa Macrogen (Seul, República da Coreia). As bibliotecas foram preparadas com o kit Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit e o sequenciamento foi conduzido na plataforma NovaSeq 6000 (Illumina, EUA).

As leituras brutas pareadas (paired-end) foram inicialmente avaliadas quanto à qualidade das bases, à presença de adaptadores e a possíveis contaminações, utilizando o software FastQC. Em seguida, as leituras foram submetidas à filtragem pelo software Trimmomatic (v0.36) (BOLGER et al., 2014), empregando os parâmetros padrão (tamanho de janela = 4, qualidade média mínima = 15 e comprimento mínimo de leitura = 36 pb).

As leituras filtradas foram alinhadas ao genoma de referência da soja (*Glycine max*, versão *Glycine_max_v2.1*) com o software HISAT2 (v2.2.1) (KIM et al., 2015). Os arquivos gerados no formato SAM foram convertidos para o formato BAM e, posteriormente, ordenados com o auxílio do software SAMtools (v1.17). A montagem e a quantificação dos transcritos foram realizadas com o software StringTie (v2.2.1). A quantificação da expressão gênica foi obtida a partir dos resultados do mapeamento de leituras, com os valores normalizados em Transcripts Per Million (TPM).

A análise de expressão diferencial foi conduzida com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) utilizando o pacote DESeq2 no ambiente R (v4.4.2). Foram considerados diferencialmente expressos os genes que

apresentaram valor de $P < 0,05$ e variação de expressão superior a duas vezes (fold change > 2 para genes induzidos ou $< 0,5$ para genes reprimidos).

A análise de agrupamento hierárquico foi realizada para avaliar a similaridade entre as amostras, com os resultados apresentados em mapas de calor (heatmaps) e em dendrogramas. Adicionalmente, foi conduzida análise de enriquecimento de conjuntos gênicos com base na base de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), considerando genes com diferenças estatisticamente significativas.

5.9 Análise estatística e elaboração de gráficos e figuras

A estatística aplicada aos dados obtidos nos ensaios de análise da fração cultrável e da FDA foi calculada no R (R Core Team 2023). Os efeitos dos tratamentos aplicados nos ensaios foram comparados através de análises de variância ANOVA (Função AOV, pacote base, R Core Team 2023). Para todas as análises foi assumido um erro de 5% ($\alpha = 0.05$), e em seguida foi realizado teste Tukey de comparação múltipla à posteriori (função TukeyHSD, pacote base, R Core Team 2023). As análises ecológicas de alfa-diversidade aplicadas às comunidades bacterianas e fúngicas foram calculadas com base nos índices de Shannon e de Chao1. A beta-diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas foi calculada a partir de matrizes de abundância de ASVs e avaliada com base na matriz de dissimilaridade de bray-curtis. O mesmo método foi aplicado ao sequenciamento de transcritos, no qual a matriz-base foi elaborada com base no número de reads. Aspectos referentes à proximidade entre as comunidades dos diferentes compartimentos, bem como entre suas amostras de origem, foram visualizados por meio de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Para elaboração dos mapas de calor referentes ao transcriptoma à ecoplaca, os valores foram convertidos para o Log na base 10, e foi utilizado o pacote “pheatmap” para desenhar o gráfico (KOLDE & KOLDE 2015). A análise dos dados de *metabarcoding* foi possível com os pacotes Phyloseq (MCMURDIE & HOLMES, 2012) e Microeco (LIU et al., 2015), no ambiente Rstudio. Os pacotes ggplot2 (WICKHAM, 2016) e RColorBrewer (NEUWIRTH, 2014) foram utilizados na elaboração dos gráficos. As figuras de

autoria própria foram desenvolvidas na plataforma Biorender.com (BIORENDER, 2025), e a lapidação de algumas figuras, bem como a elaboração de pranchas e a organização de imagens, foram realizadas na plataforma Canva.com (CANVA, 2025).

6. Resultados

Após 10 dias de crescimento em casa de vegetação, as plântulas foram colhidas; os compartimentos foram cuidadosamente separados e processados para as análises mencionadas, em sistemas de amostragem compostos. Os resultados observados estão descritos abaixo.

6.1 Capacidade funcional das comunidades

Em todos os meios seletivos inoculados, houve crescimento de colônias de bactérias e de fungos oriundos das comunidades associadas aos compartimentos. Observando a figura 7, é possível observar distinções na morfologia das comunidades (cor, bordo, brilho, textura, tamanho) e na interação com o principal substrato suplementado nos meios.

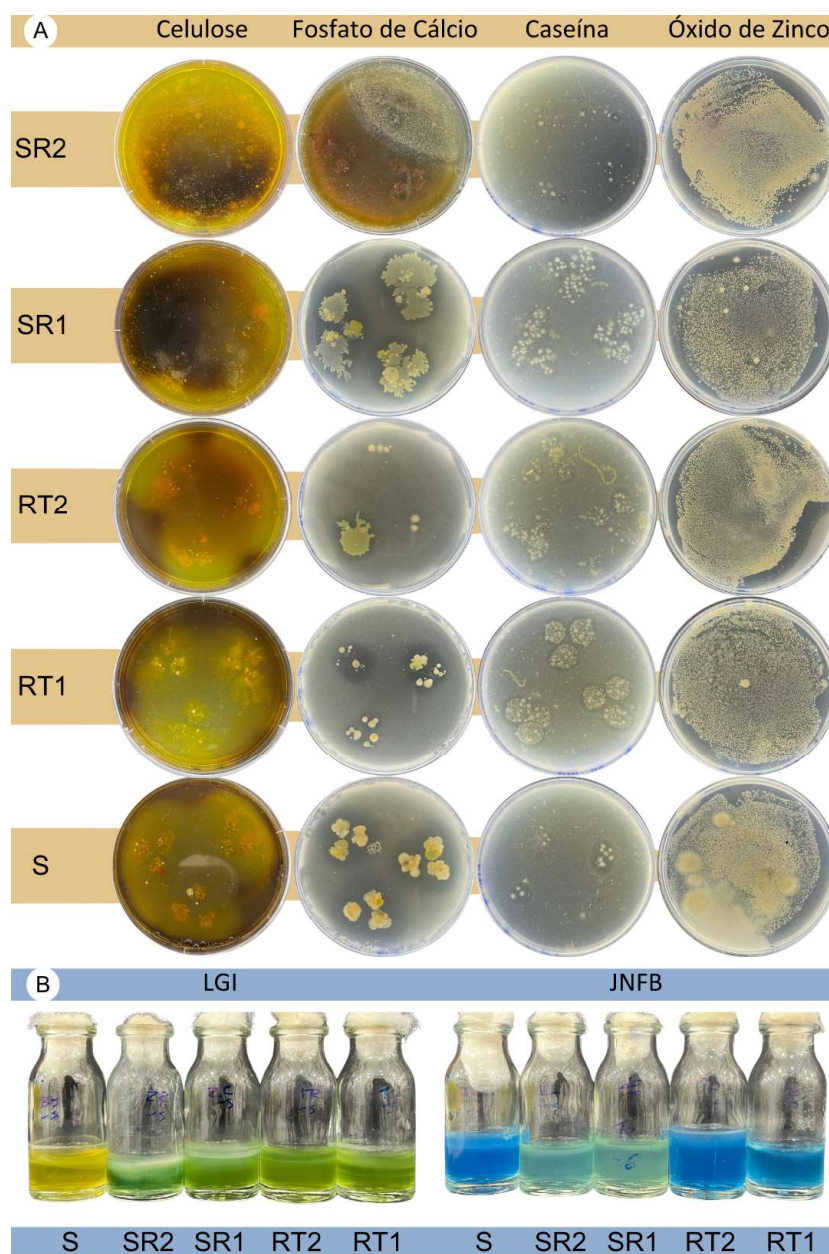


Figura 7. (A) Placas com meios de cultura seletivos inoculadas com a diluição de 10^{-3} células de cada compartimento estudado. E (B) meios de cultura semi-sólidos LGI e JNFB, inoculados com a diluição de 10^{-4} células, exibindo película aerotática.

O meio suplementado com óxido de zinco apresentou abundância de colônias, em contraste com a baixa diversidade aparente, inferida pela semelhança entre as colônias que cresceram, o que pode indicar o crescimento de uma espécie ou grupo dominante quando disponível o respectivo suplemento do meio. No meio de cultura suplementado com caseína, a atividade proteolítica foi distinta entre os

compartimentos comparados, é possível ver a formação de halo clarificado ao entorno das comunidades inoculadas, no entanto o número de colônias é baixo nas comunidades BS (15) e SR2 (~25), enquanto nos demais compartimentos, apresentou valores incontáveis. O meio suplementado com fosfato de cálcio apresenta a maior diversidade aparente de colônias, que, apesar de se misturarem, o que impossibilita a contagem (assim como no meio suplementado com celulose), exibem o halo indicativo de atividade solubilizadora no entorno das comunidades. Ainda referente a esse substrato, na placa correspondente à SR2 estabeleceu-se um cenário de antagonismo entre um fungo e bactérias que cresceram do lado oposto da placa. As placas que continham celulose, após reveladas com solução de Lugol, apresentaram diversidade de comunidades e de consumo da matéria-prima. As comunidades rizosféricas (SR1 e SR2) foram as que menos aproveitaram o conteúdo de celulose do meio, enquanto as do solo (BS) e da coifa (RT1) consumiram com maior avidez.

Os meios de cultura semissólidos demonstraram que, em todos os compartimentos, havia microrganismos potencialmente fixadores de nitrogênio. Isso pode ser inferido a partir da observação da formação de película aerotática sobre os meios, com o propósito de isolá-los da coluna de ar capaz de inibir a atividade da nitrogenase.

A partir dos diferentes meios de cultura, muitos microrganismos foram isolados conforme a forma como se distinguiram em cada comunidade observada, com o objetivo de caracterizá-los separadamente no futuro e realizar ensaios bioquímicos, visando promover o crescimento vegetal.

O desenvolvimento médio da cor dos poços da ecoplaca, avaliado a cada 8 horas, demonstrou que cada comunidade apresenta um ritmo de consumo dos substratos em geral, enquanto os índices ecológicos aplicados mostram padrões semelhantes no que tange à diversidade do consumo (Figura 8).

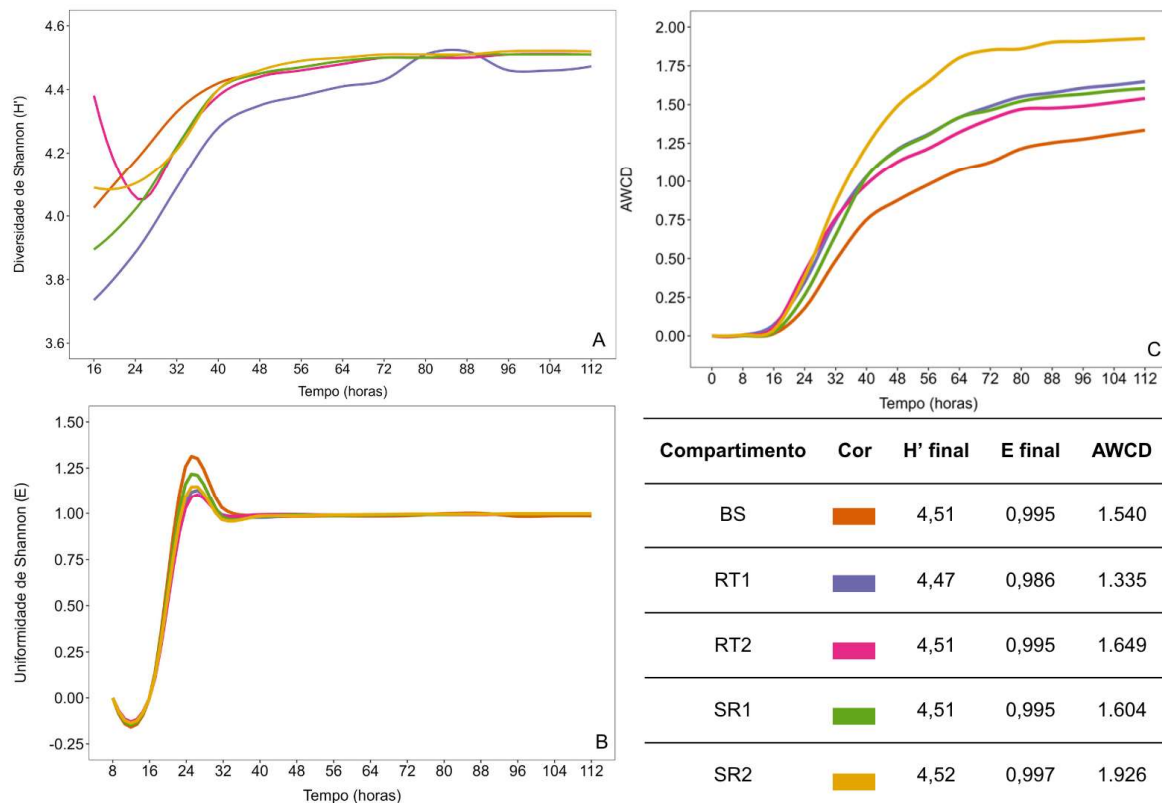


Figura 8. A aplicação de índices ecológicos, como forma de medir padrões de consumo de substrato pelas bactérias, permite compreender melhor a diversidade dessa capacidade metabólica (A) e a uniformidade desse consumo (B). O valor médio do desenvolvimento da cor dos poços (AWCD) representa a progressão do consumo ao longo de toda a placa em cada comunidade (C).

Durante as primeiras 16 horas, as comunidades não apresentaram consumo significativo dos substratos presentes nos poços (Figura 8-C). Após esse período, o consumo foi exponencial em todas as comunidades, em todos os compartimentos. A comunidade de SR2 apresentou maior eficiência, consumindo em ritmo acelerado até as 56 horas, enquanto a comunidade de RT1 apresentou um consumo médio mais lento. As demais comunidades apresentaram valores médios de consumo em comparação com esses dois extremos, e assim como os demais, apresentou consumo estável após 72h.

No início do ensaio, à medida que cada comunidade começa a se desenvolver nos poços e a metabolizar seus substratos, os valores de H' tornam-se mais distintos (Figura 8-A). RT1 apresenta os menores valores ao longo de quase todo o ensaio, iniciando em 3,7 e finalizando em 4,47 – ainda que próximo dos demais, o

menor. A respeito da uniformidade do consumo desses substratos (Figura 8-B), as comunidades de todos os compartimentos foram semelhantes ao longo do ensaio. Houve um aumento exponencial entre as 16h e as 24h, no qual a comunidade microbiana do solo atingiu o pico de 1,3, e, nas 8h seguintes, todas as comunidades se estabilizaram, apresentando $E = 1$.

O mapa de calor elaborado na Figura 9 permite compreender a dinâmica do consumo final de cada substrato na ecoplaca, e o dendrograma, na parte superior, agrupa os compartimentos com base em semelhanças nesse consumo.

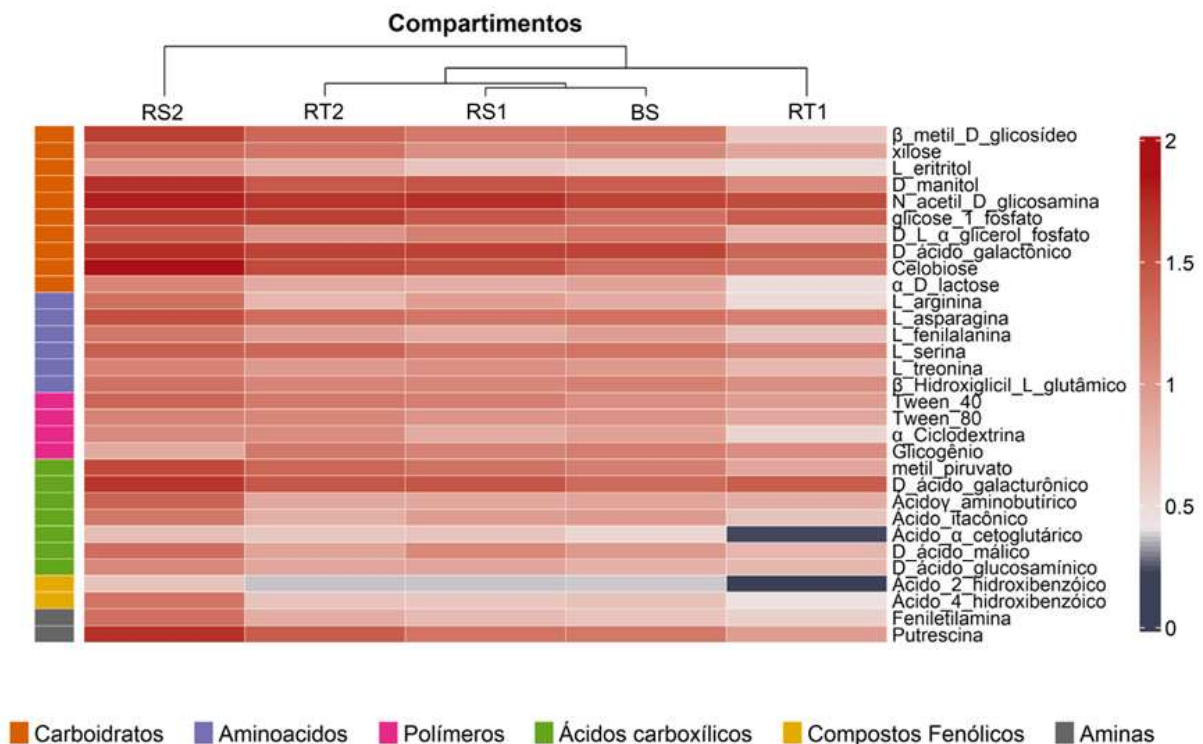


Figura 9. Mapa de calor mostrando a taxa de consumo final de 31 substratos diferentes pelas comunidades de cada compartimento, cultivadas em Ecoplacas Biolog por 112 horas de incubação. Tons mais escuros de vermelho indicam maior consumo, enquanto tons mais escuros de cinza indicam menor consumo. Ao lado do mapa de calor está sinalizado a que grupo de fontes de carbono pertence cada substrato.

Todas as comunidades foram capazes de metabolizar os substratos disponíveis, exceto o ácido alfa-cetoglutarato e o ácido 2-hidroxibenzóico, que não foram metabolizados pela comunidade RT1 e apresentaram baixas taxas de consumo em relação às demais comunidades. Os substratos mais consumidos em geral foram os carboidratos, enquanto os menos aceitos foram os compostos fenólicos. A comunidade oriunda de SR2 apresentou as maiores taxas de consumo quando comparada às demais, enquanto RT1 apresentou os menores valores em praticamente todos os substratos. O agrupamento realizado com base nas distâncias euclidianas entre os compartimentos, mostra que além do claro distanciamento entre RT1 e SR2, este último está mais próximo do consumo de RT2, enquanto o consumo de SR1 é mais próximo do consumo da comunidade do solo-a-granel (Figura 9).

6.2 Microscopia e expressão gênica diferencial em raízes

A microscopia eletrônica de varredura auxilia a elucidar diferenças entre os compartimentos RT1 e RT2 por meio de variações topográficas que podem influenciar o estabelecimento de microrganismos (Figura 10). A prancha 1 destaca regiões da zona de ramificação que fornecem habitats para microrganismos que possam obter alguma vantagem adaptativa.

Por exemplo, as axilas das raízes laterais (C), que servem como porta de entrada para o interior da planta de microrganismos endofíticos, como o *Herbaspirillum* (citar). Além delas, os pelos radiculares (B) servem como pontos de ancoragem para o agregamento de biofilme (F) e de microrganismos ali imersos. O rizoplane da zona de ramificação (A), protegido pela abundância de pelos, pode fornecer uma região abrigada (D) do contato direto com as partículas do solo.

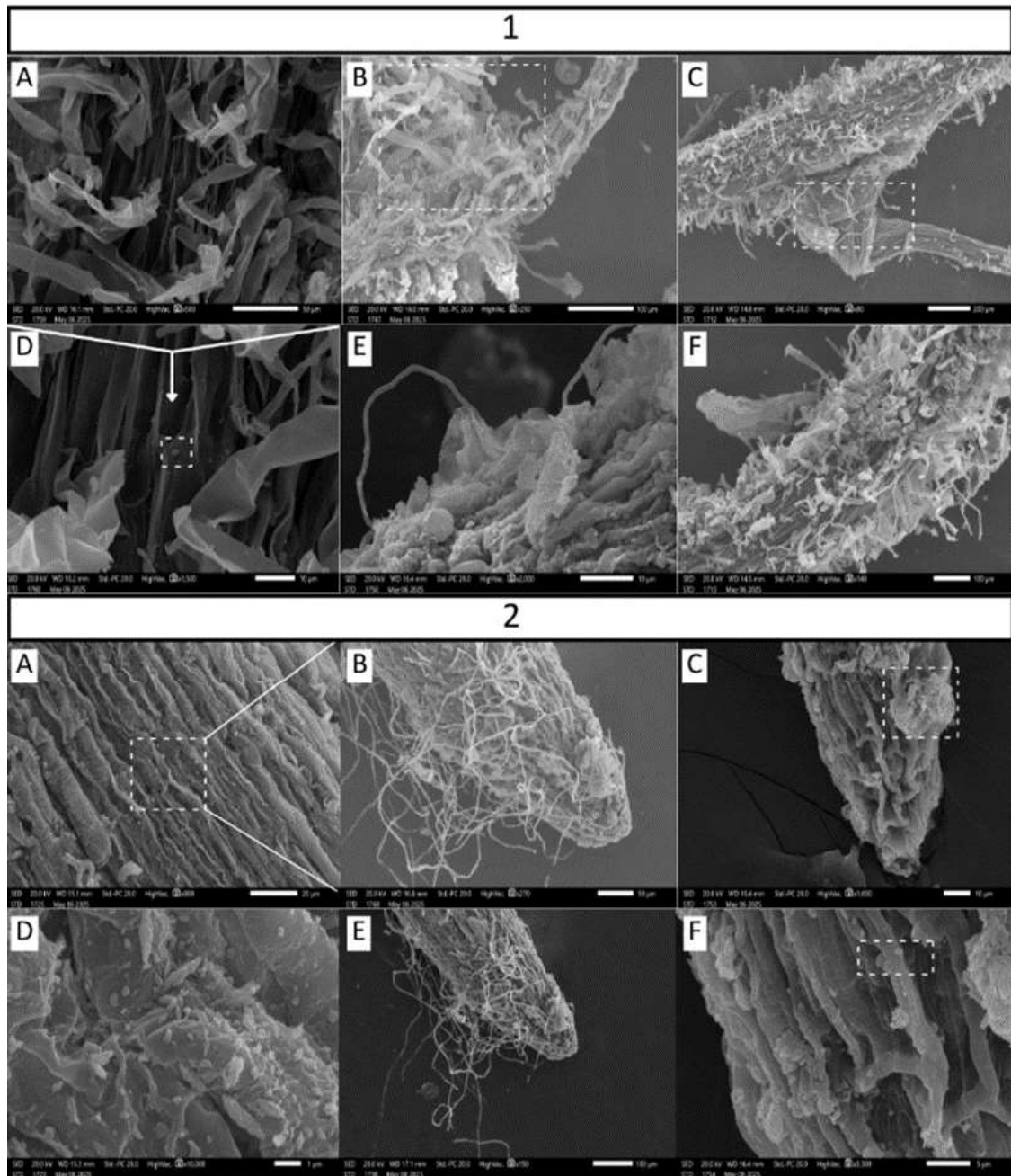


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura das duas regiões radiculares analisadas: Zona de ramificação (RT1) e Coifa + Zona de alongamento (RT2), destacando traços da sua estrutura e a presença de microrganismos na sua superfície.

A coifa e zona de alongamento (Prancha 2) por sua vez, se revelam como regiões de maior exposição, e que oferecem menor superfície de contato, isso decorrente das funções de cada uma das extremidades para a fisiologia e interação das plantas com o meio. Em A, D e F é possível observar bactérias que se

destacam sobre o rizoplano, enquanto B e E apresentam uma coifa colonizada por hifas fúngicas. Ainda, a figura C mostra um agrupamento semelhante a um biofilme bacteriano.

O TTC, ao entrar em contato com as células, age como indicador da atividade metabólica microbiana ao ser reduzido e corar as regiões onde está ligado (BROWN et al., 2013). Assim, a pigmentação nas raízes indica colonização microbiana (Figura 11).

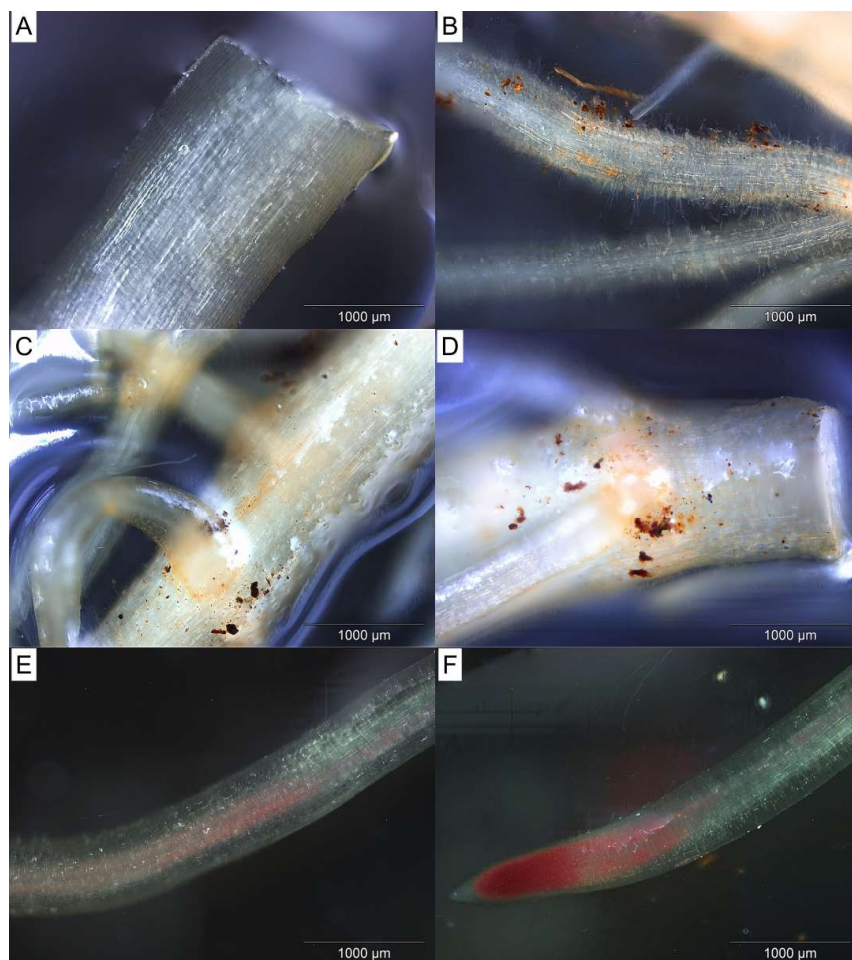


Figura 11. Raízes coradas com tetrazólio indicando a presença de micro-organismos em regiões com acúmulo de pigmentação avermelhada.

Para ter como base, a figura 11-A representa uma zona registrada em RT2, totalmente ausente de microrganismos, na qual não se observa pigmentação. As imagens 11-B, 11-C e 11-D foram obtidas na mesma região radicular. A primeira permite observar o acúmulo de pigmentos nos pelos radiculares, e as duas figuras seguintes mostram que o pigmento se acumula em áreas próximas à inserção das raízes laterais. A figura 11-E representa um trecho da zona de alongamento, no qual se observa acúmulo de pigmentos no interior, indicando a presença de microrganismos endofíticos que provavelmente alcançaram essa região por meio da coifa (BARBOSA et al., 2015). O maior acúmulo de pigmentos foi observado exatamente na coifa (Figura 11-F), em um tom mais escuro na sua extremidade que se desvanece sentido à zona de alongamento.

Ao todo, 57.148 genes foram mapeados com base no genoma de *Glycine max* v2.1. A partir destes, 38.802 obtiveram uma quantidade estatisticamente significativa de reads (ou seja, foram de fato expressos na amostra). Mais dados sobre o alinhamento e a qualidade dos transcritos: vide Apêndice A - Tabela 5.

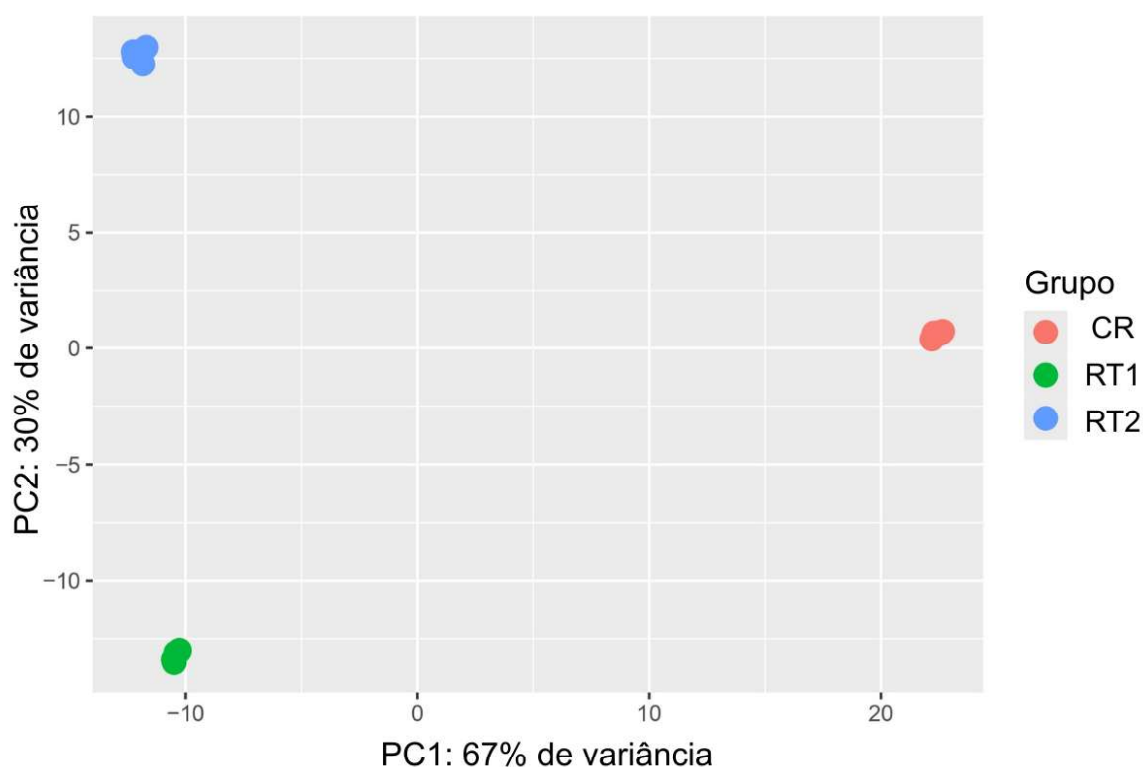


Figura 12. Análise de componentes principais capaz de explicar a distinção entre os compartimentos a partir da raiz total (CR), por meio de seus genes diferencialmente expressos.

Os compartimentos compostos por tecido radicular - RT1 e RT2 - bem como a raiz completa (CR) apresentaram expressão gênica diferencial quando comparados, com 30% de variância explicada no eixo Y e 67% no eixo X entre os compartimentos e a raiz completa (Figura 12).

Comparações entre os compartimentos analisados sobrepostos à raiz total mostraram diferenças significativas no perfil de expressão gênica, com mais genes down-regulados do que up-regulados (Figura 13).

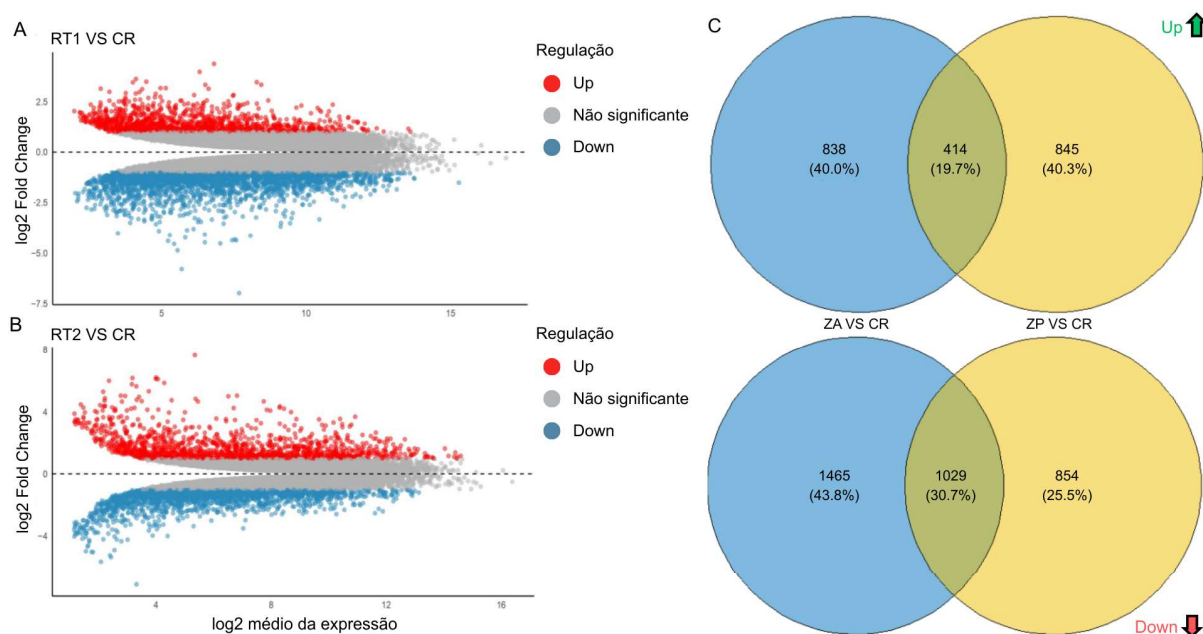


Figura 13. Os gráficos “vulcão” indicam os padrões de expressão comparados entre a raiz total (CR) e as zonas RT1 (A) e RT2 (B). Enquanto os conjuntos (C) mostram o número de genes Up e Down regulados, únicos e compartilhados, em cada compartimento quando comparados à raiz completa.

Os gráficos vulcânicos (Figura 13-A e B) foram desenvolvidos para representar o posicionamento dos genes, com base na expressão relevante de GDEs ou não significativos. Os pontos cinza próximos à linha tracejada ($\log_2$ fold change = 0) representam genes cuja expressão não foi significativa para up- ou down-regulação.

Pontos azuis abaixo do cinza representam genes down-regulados, que, na figura 13-A, se estendem de $\log_2 FC = -1$ a $-7,5$, com amplitude maior do que a observada na figura 13-B (-1 a -4). O padrão de genes up-regulados opõe-se ao mencionado anteriormente. Pontos vermelhos no gráfico indicam, na figura 13-A, que os genes up-regulados em RT1 alcançam valor máximo de $\log_2 FC = 5$, enquanto, na figura 13-B, os genes up-regulados em RT2 chegam a atingir valores próximos de 8.

Comparações entre cada compartimento e a raiz completa indicaram que, na zona apical (RT1), a expressão diferencial identificou 838 genes up-regulados e 1465 genes down-regulados. A zona de ramificação e emissão de pelos (RT2) apresentou mais genes up-regulados (845) do que genes down-regulados (854). Além disso, 414 genes foram up-regulados em ambos os compartimentos, e, para os down-regulados em comum, esse número foi 2,5x maior (1029 genes) (Figura 13-C).

A figura 14 foi elaborada para ranquear os 30 genes up-regulados mais expressos em RT1 vs. CR acompanhados de sua ontologia. O termo GO que apresentou o maior número de genes (20) foi relativo a uma “proteína da família de proteínas ribossomais L31”. E os maiores valores de expressão ($-\log_{10} > 0,30$) foram observados nesse mesmo gene e no “fator 4G de iniciação da translação em eucariotos”.

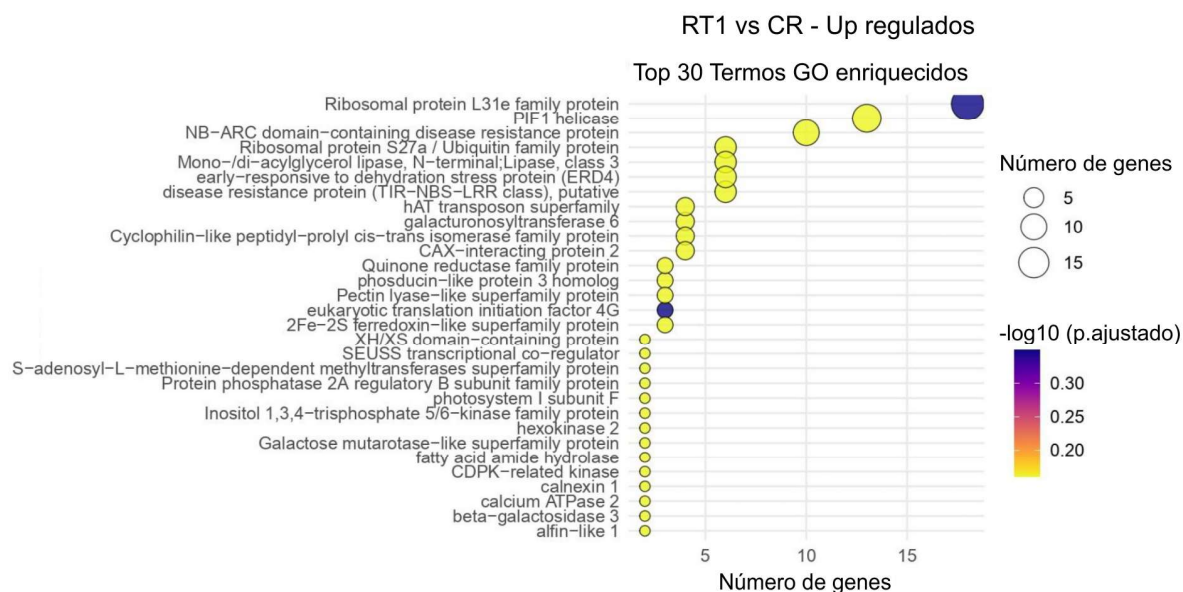


Figura 14. Os 30 termos “Gene Ontology” mais expressos no tecido da coifa (RT1) em comparação à raiz completa.

Outros genes relacionados à estrutura e à fisiologia deste compartimento radicular compõem o modelo, com número de genes entre 1 e 15 e valores de expressão = $-\log_{10} < 0,20$.

Já a figura 15 apresenta o ranking dos 30 genes up-regulados mais expressos em RT2 vs. CR, acompanhado de sua ontologia. Os termos GO que apresentaram maior número de genes (12-16) foram relativos à “helicase “PIF1”, “proteína relacionada à extrusão de prótons do tipo CemA”, “superfamília de proteínas oxigenase dependentes de 2OG e Fe²⁺”, e a “proteína da família de proteínas ribossomais L31”, que também foi observada no outro compartimento (figura 19). Os maiores valores de expressão ($-\log_{10} > 0,14$) foram vistos nas duas primeiras citadas e em outras 8: “aspartil protease”, Cisteína proteinase”, Beta-galactosidase 3”, proteína de domínio XH/XS”, “co-regulador transcricional SEUSS”, “proteína da família NDPK/NME” e “proteína da família “NTF2”.

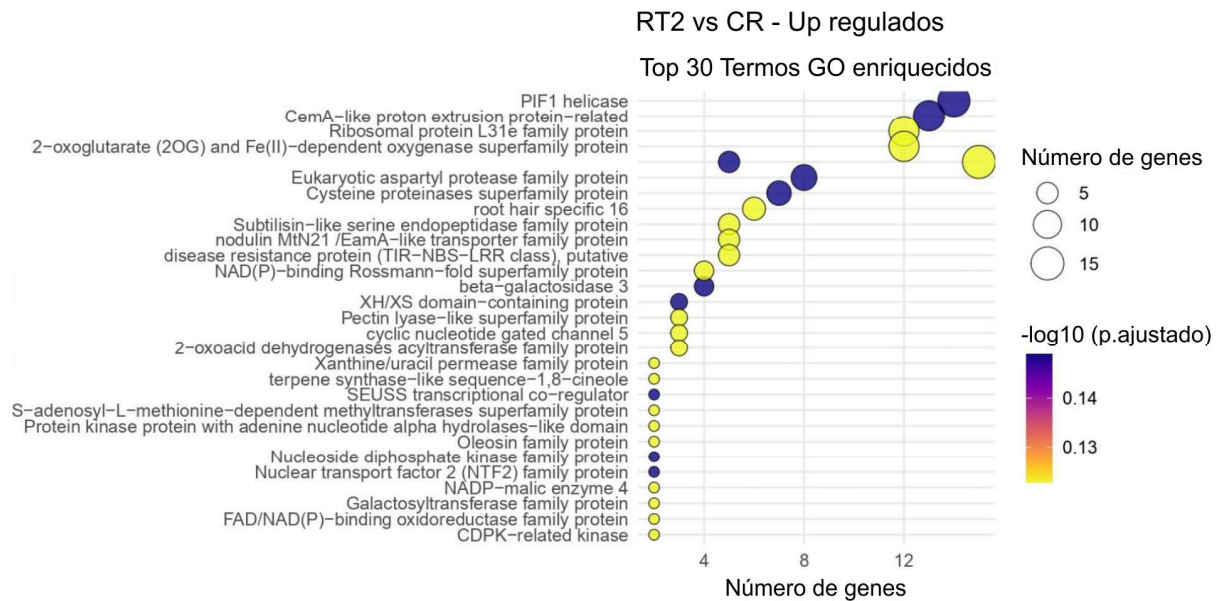


Figura 15. Os 30 termos “Gene Ontology” mais expressos no tecido da zona de ramificação (RT2) em comparação com a raiz completa.

Outros genes relacionados à estrutura e à fisiologia deste compartimento radicular compõem o modelo, com número de genes entre 1 e 8 e valores de expressão = $-\log_{10} < 0,13$.

Dentre os genes diferencialmente expressos identificados na análise, foram selecionados genes relevantes para a interação planta-microrganismo, como genes ligados à produção de flavonoides e isoflavonoides (Figura 16), utilizados na sinalização para nodulação, e genes ligados à síntese de diferentes compostos de carbono, relevantes para o metabolismo vegetal, mas também de interesse de alguns grupos microbianos, como citrato e sacarose (Figura 17).

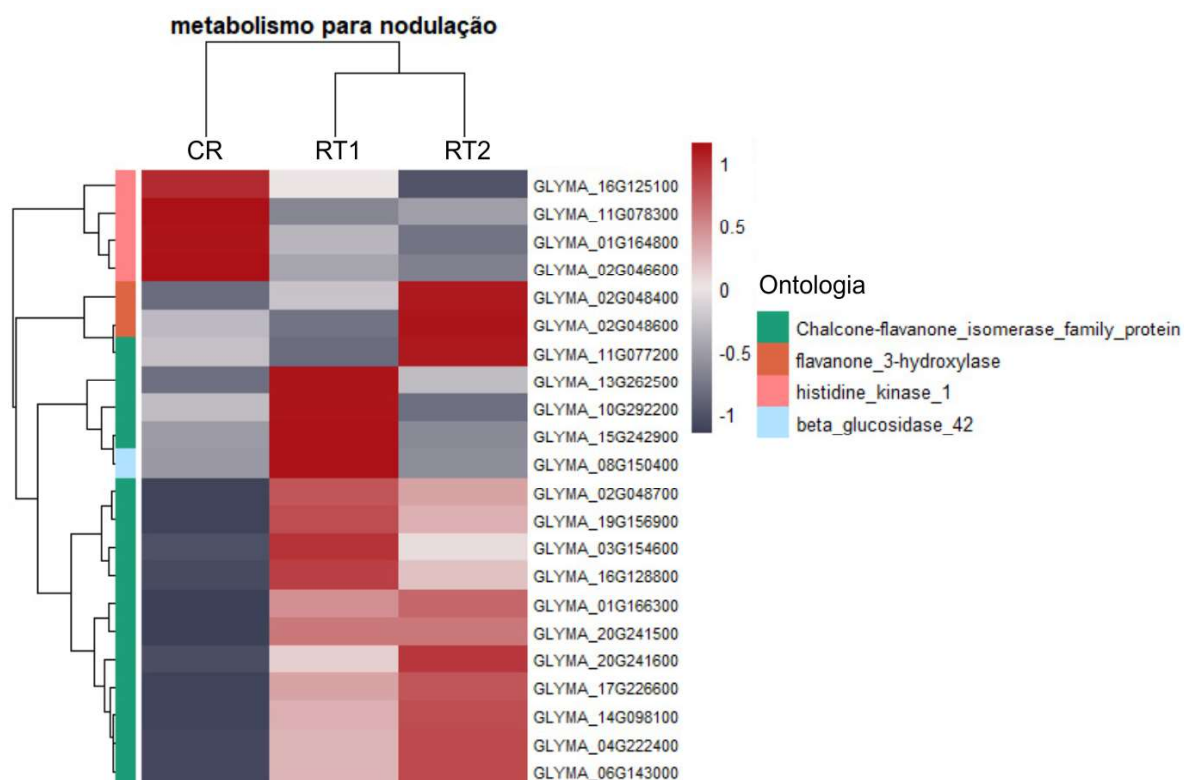


Figura 16. Mapas de calor comparam a expressão diferencial de genes ligados à produção de compostos relevantes para a comunicação entre a raiz e os microrganismos fixadores de nitrogênio. Na escala de cores, o vermelho indica valores mais elevados de expressão, enquanto o azul, menores (a escala foi elaborada a partir do $\text{Log}_2 \text{TPM} + 1$ e da média das réplicas). Os códigos GLYMA referem-se à nomenclatura de cada gene avaliado.

A maioria dos genes associados à biossíntese de flavonoides e isoflavonoides (Figura 16) apresentou expressão diferencial entre os compartimentos radiculares analisados (RT1 e RT2). Entre os genes avaliados, aquele que codifica uma proteína do tipo histidina quinase 1 apresentou expressão uniforme ao longo de toda a raiz (CR). Por outro lado, o gene codificante da enzima chalcone–flavone isomerase apresentou expressão em ambos os compartimentos, com maior intensidade em RT1. Neste mesmo compartimento, predominou a expressão de beta-glucosidase 42. Em contraste, o gene codificante da flavona 3-hidroxilase apresentou maior expressão em RT2, enquanto era pouco expresso em RT1.

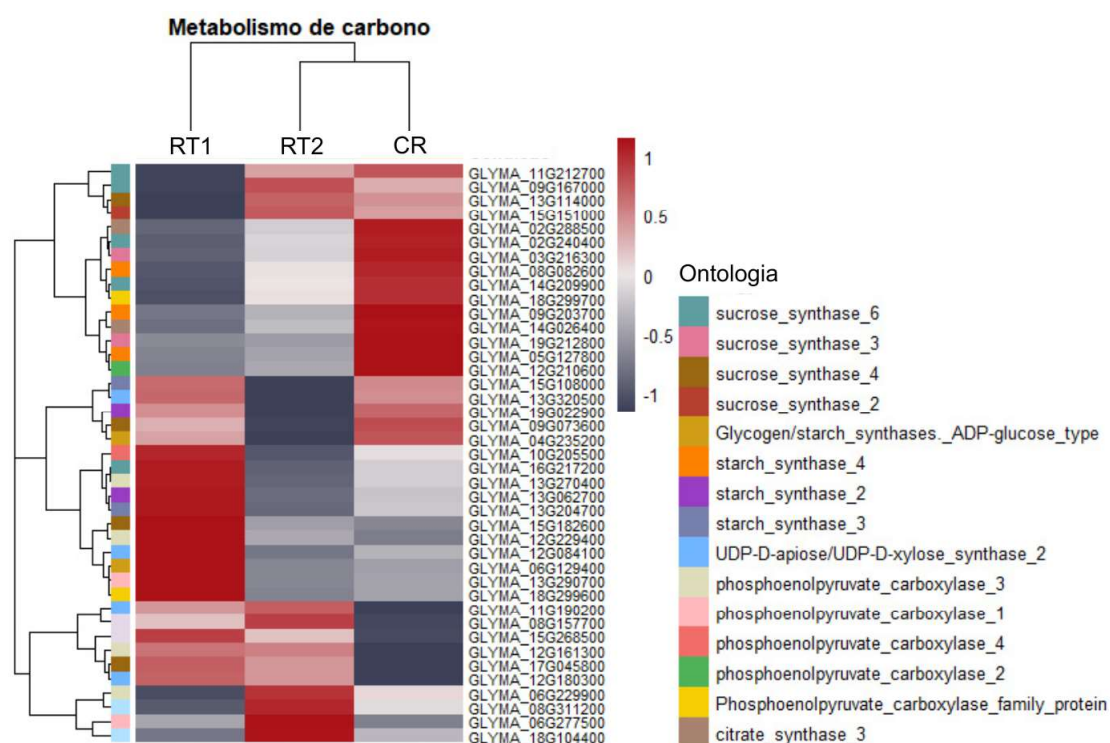


Figura 17. Mapas de calor comparam a expressão diferencial de genes ligados à produção de compostos de carbono. Na escala de cores, o vermelho indica valores mais elevados de expressão, enquanto o azul, menores (a escala foi elaborada a partir do Log2 TPM + 1 e da média das réplicas). Os códigos GLYMA referem-se à nomenclatura de cada gene avaliado.

A expressão de genes da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) foi maior em RT1, enquanto RT2 apresentou maior expressão de genes associados à citrato sintase. Além disso, a maioria dos genes envolvidos na síntese de sacarose e de amido apresentou distribuição ao longo de toda a raiz (CR), que também expressou alguns genes relacionados à produção de citrato e à atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (Figura 17). Diferentemente da expressão dos genes associados ao metabolismo de flavonoides (Figura 16), a síntese de compostos de carbono foi mais uniformemente distribuída entre os compartimentos.

6.3 Dimensões, distribuição e ecologia das comunidades

O número de unidades formadoras de colônia observado é maior no solo à granel (BS), com aproximadamente $1,3 \times 10^7$ microrganismos, e decai ao longo

das rizosferas, em direção aos tecidos radiculares, onde se observa o menor valor no tecido da zona de ramificação (RT2), de aproximadamente 4.0×10^6 (Figura 16-A).

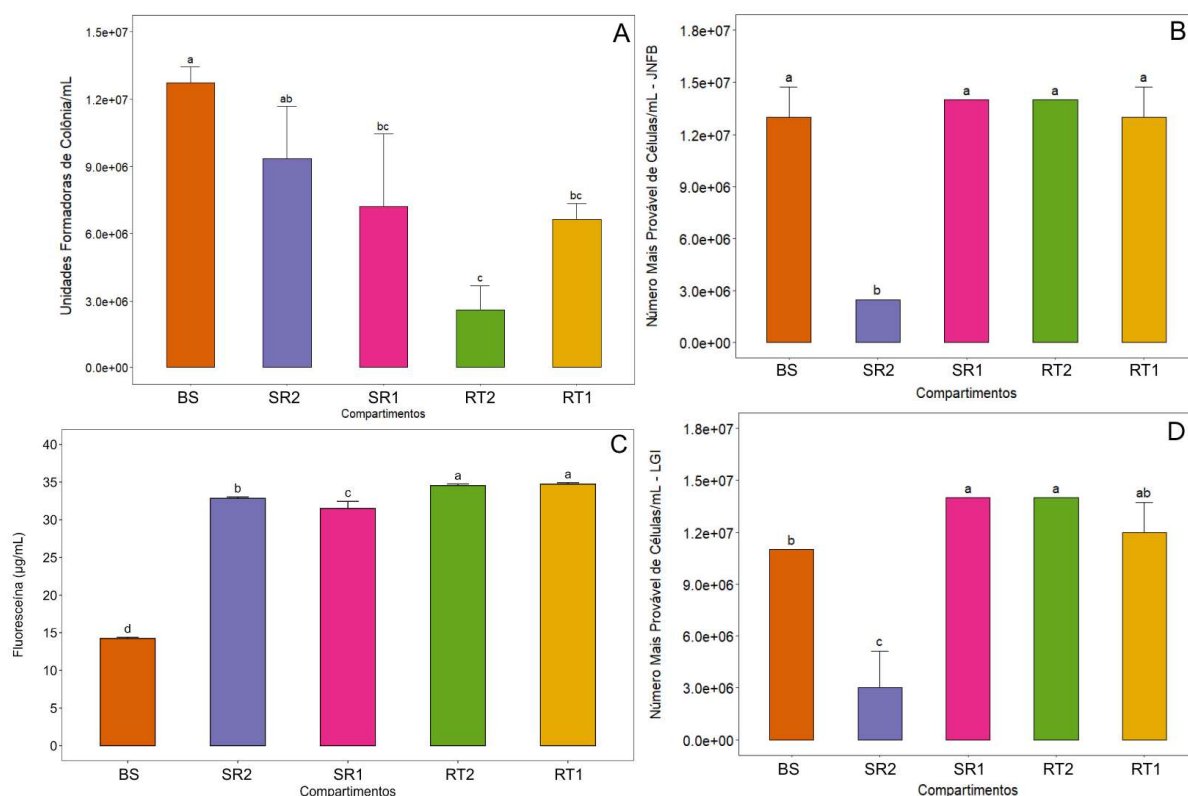


Figura 18. Número de unidades formadoras de colônia resultante da contagem (A), seguido do número de fluoresceína liberada pela comunidade de cada compartimento (C) e do número mais provável de células/mL (NMP) nos meios de cultura JNFB (B) e Lgi (D).

O NMP/mL observado no meio JNFB (Figura 16-B) apresentou valores estatisticamente semelhantes em todos os compartimentos (ADICIONAR VALOR DE P), com valores entre 1.2×10^7 e 1.5×10^7 ; com exceção de SR2, que apresentou $\text{NMP/mL} = 3.0 \times 10^6$, um valor em torno de 4 vezes menor que o observado nos demais compartimentos. No meio LGI (Figura 16-D), o padrão se repetiu: SR2 apresentou 3,6 vezes menos micro-organismos diazotróficos do que a segunda menor comunidade (BS). Enquanto SR1 e RT2 apresentaram os maiores valores e se assemelham estatisticamente. As fontes de carbono que diferem entre os meios

de cultura foram aproveitadas de forma semelhante pelas comunidades, sem distinção relevante.

A menor atividade microbiana foi observada no solo (Figura 16-C), com densidade óptica de 1, equivalente a aproximadamente 14 $\mu\text{g/mL}$. Os compartimentos de rizosfera apresentaram os valores mais altos, diferindo estatisticamente dos demais, mas não entre si, com média de 32 $\mu\text{g/mL}$, 2,4 vezes mais alta do que o solo a granel.

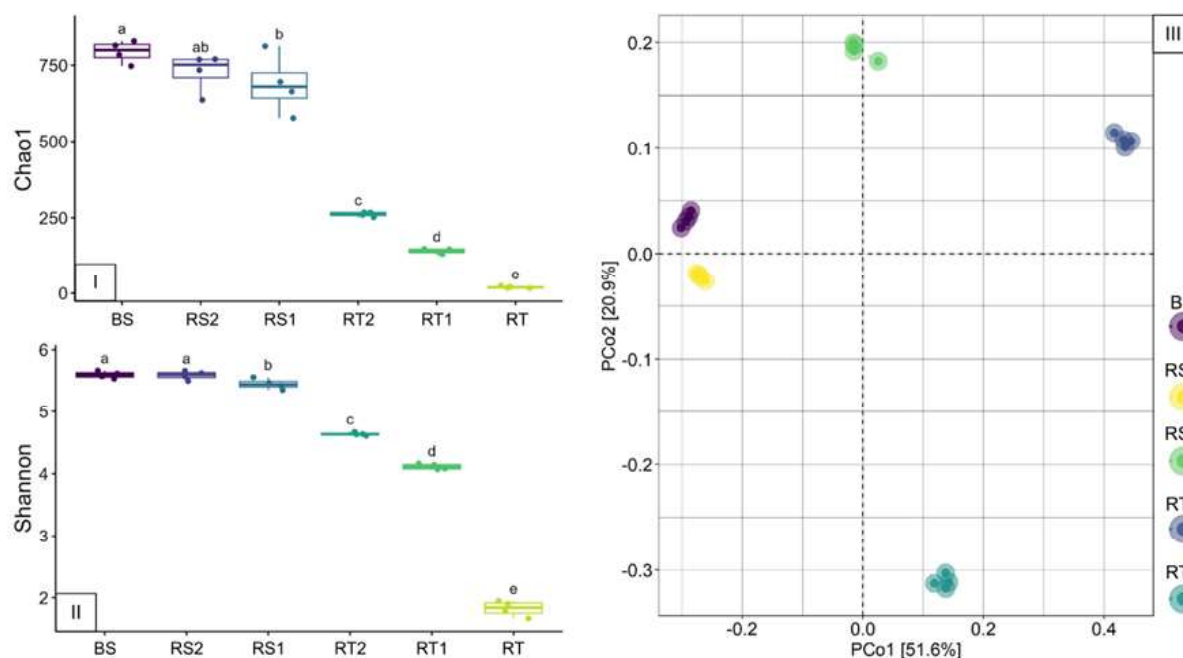


Figura 19. Índices ecológicos aplicados às comunidades bacterianas dos compartimentos, que representam o número de espécies (I), a diversidade alfa (II) e a diversidade beta (III).

O Índice *Chao1* (Figura 17-I), que representa o número de espécies bacterianas em cada compartimento, considerando válida a presença de espécies raras em cada amostra, destaca o solo como o ambiente mais rico em espécies, com mais de 750, enquanto as rizosferas apresentam número menor, mas, em SR2, se relaciona com ambos os outros. Nos tecidos radiculares, o número de espécies

observado é consideravelmente menor: RT2 apresenta um terço do número de espécies presentes no solo, e em RT0, o número está na casa das dezenas.

O índice de *Shannon* (Figura 17-II) ordena os tratamentos de forma semelhante. O solo é o ambiente mais diverso entre os compartimentos, aqui igualado à SR2 (ambos com média de 5,5). Enquanto isso, os demais compartimentos se diferenciam mais, com $H' = 5,3$ para SR1, e valores entre 4 e 4,2 para RT1 e RT2 respectivamente. Em RT0, o resultado é a metade do observado nos demais compartimentos teciduais ($S = 2$). A diversidade beta (Figura 17-III), por meio da comparação dos táxons de cada comunidade bacteriana, comparando-as umas com as outras, demonstra que as comunidades observadas são de fato distintas, com 51,6% da variação sendo explicada pela distância do eixo X, e 20,9% pela distância do eixo Y corroborando a identidade de cada comunidade como individual e única.

A análise dos dados sequenciados por metabarcoding da região V4 do rRNA 16S identificou, após os procedimentos de filtragem de qualidade, correção de erros e remoção de sequências quiméricas, 3.397 ASVs bacterianas. O número de leituras (*reads*) presentes em cada amostra, ao início e ao final do processamento, encontra-se descrito no Apêndice A – Tabela 1.

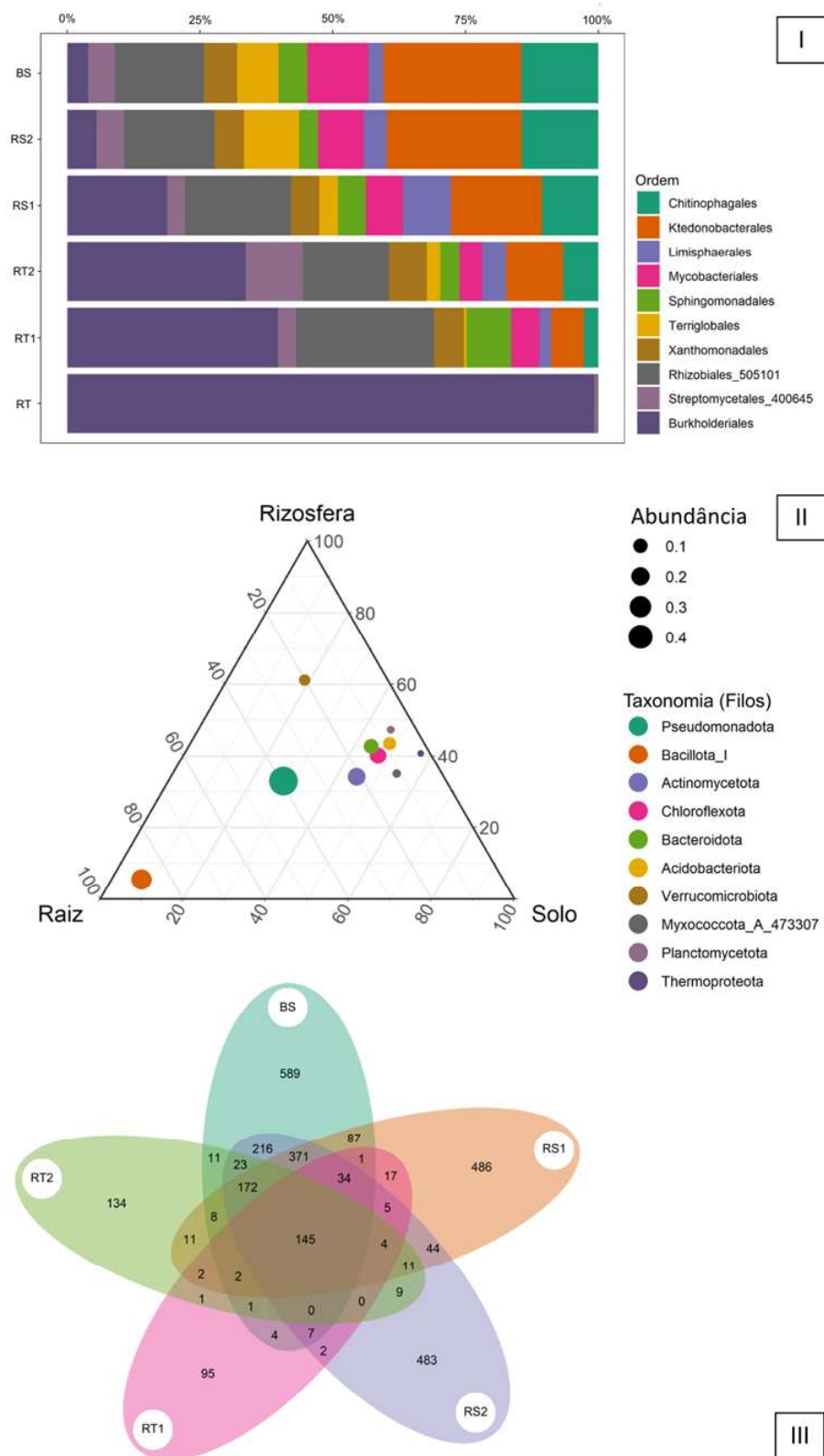


Figura 20. Abundância relativa das dez ordens de bactérias mais abundantes em cada compartimento analisado (I). Influência de cada zona do eixo solo-planta na distribuição dos 10 filos

de bactérias mais abundantes observados (II). O diagrama de Venn destaca o número de táxons exclusivos e compartilhados em cada compartimento (III).

O solo e as rizosferas consolidam-se como os ambientes mais diversos, nos quais há maior equilíbrio na distribuição das dez ordens mais abundantes. Nos tecidos radiculares, por outro lado, a ordem Burkholderiales se mostra mais abundante, chegando a dominar mais de 30% da abundância relativa no tecido da coifa (RT1) e 98% na radícula germinada em sistema axênico (RT0) (Figura 5-I). Ao observar o sistema de forma linear no sentido Solo → rizosfera → raiz, é possível notar que, à medida que Burkholderiales se torna mais abundante, outras ordens, como Chitinophagales, Ktedonobacterales, Terriglobales e Mycobacteriales, perdem gradativamente espaço no sistema (Figura 18-I).

Dentre as ordens mais abundantes no conjunto, Ktedonobacterales foi a mais abundante no solo e em SR2. SR1 apresentou um perfil mais bem distribuído, perdendo espaço para Burkholderiales e Rhizobiales, que foram as três mais predominantes. Nos tecidos radiculares, Burkholderiales apresenta a maior abundância relativa, chegando a mais de 30% em RT1 e a 98% em RT0.

A classe mais equilibrada e bem distribuída, ou seja, que sofre menos influência de um único eixo do sistema, é a Alphaproteobacteria. Dentre as dez classes mais abundantes, seis de suas distribuições são mais influenciadas pelo solo e pela rizosfera. Verrucomicrobiota tem 60% de seus indivíduos distribuídos ao longo da rizosfera, enquanto Bacilli se destaca entre as demais classes, com 90% de seus indivíduos ocupando nichos do rizoplane. Ainda, a respeito da distribuição na matriz, as classes menos abundantes estão mais próximas entre si, com exceção de Verrucomicrobiae, enquanto as de maior abundância, como Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacilli, ficam mais isoladas (Figura 18-II).

O solo apresenta o maior número de táxons observado no sistema, enquanto as rizosferas apresentam um número razoavelmente menor – SR1 e SR2 com respectivamente 103 e 106 táxons exclusivos a menos. Já os tecidos radiculares apresentam um número de táxons exclusivos consideravelmente menor; RT2 tem cerca de 25% a menos do que o solo à granel, enquanto RT1 tem 6 vezes menos

táxons exclusivos. 145 táxons bacterianos são compartilhados por todos os compartimentos avaliados; esse número representa o microbioma central do sistema, ou o *core* bacteriano (Figura 18-III).

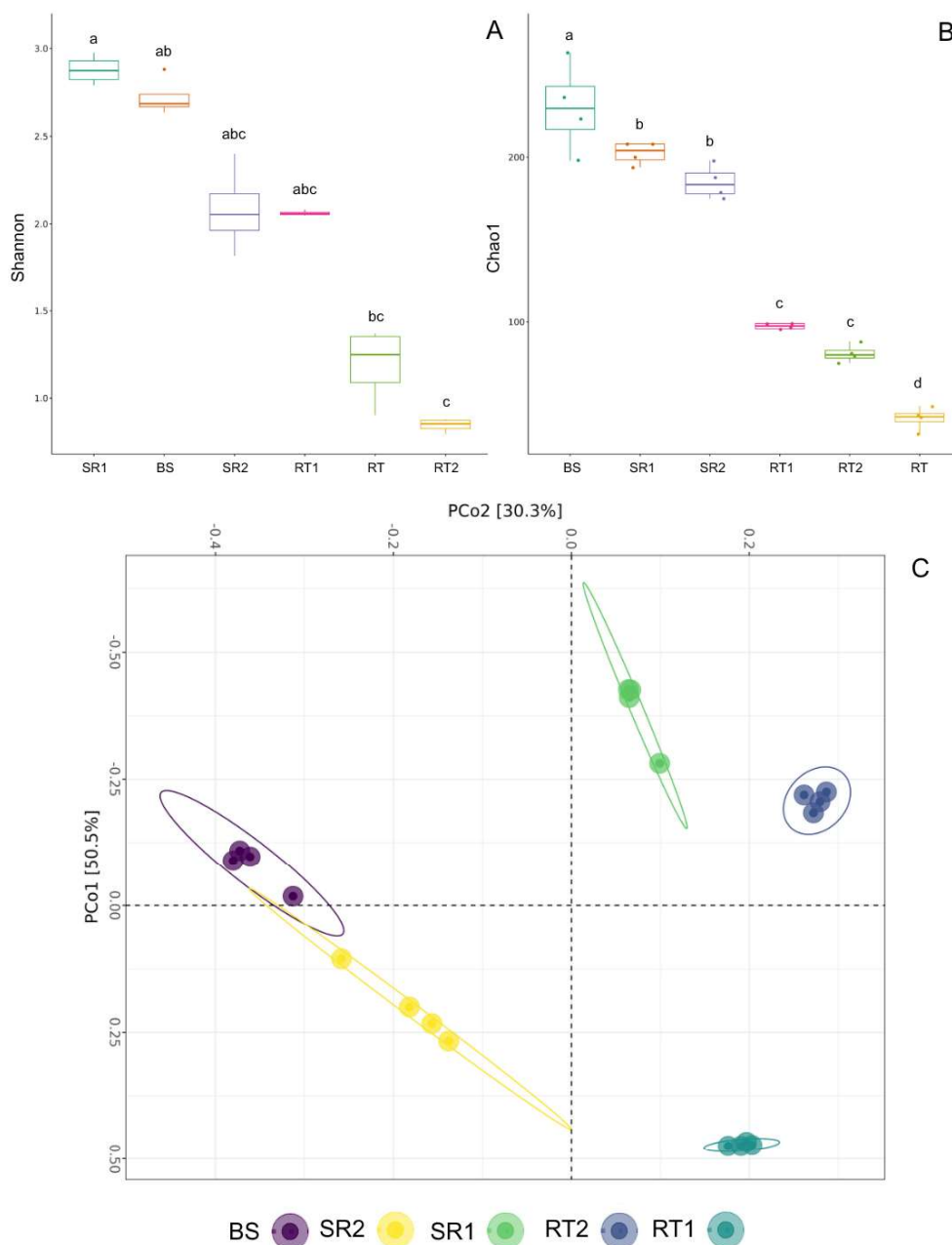


Figura 21. Índices ecológicos aplicados às comunidades fúngicas dos compartimentos, que representam o número de espécies (I), a diversidade alfa (II) e a diversidade beta (III).

O índice de diversidade de Shannon (Figura 19-A), quando aplicado às comunidades fúngicas, difere das bacterianas ao indicar o compartimento SR1 como o mais diverso ($H' = 2,8$), embora apresente elementos estatísticos em comum com o solo, ambiente mais diverso para bactérias. A menor diversidade de espécies fúngicas é observada em RT2, com $H' < 1$ (Figura 6-I). Segundo o índice de Chao1 (II), o solo apresenta mais de 225 espécies; as rizosferas (SR1 e SR2) vêm em seguida, com aproximadamente 200 espécies cada, enquanto os tecidos RT1 e RT2 apresentam ~50% menos espécies do que suas respectivas rizosferas. RT0 apresentou o menor número de espécies fúngicas, com menos de 50 (Figura 19-B).

A análise de diversidade beta (Figura 19-C) realizada por meio de PCA explica 80,8% do isolamento das comunidades, com base em seus conteúdos taxonômicos ($PCo1 = 50,5\%$ e $PCo2 = 30,3\%$), assegurando, assim, a individualidade das comunidades fúngicas de cada compartimento. Assim como observado na distinção das comunidades bacterianas (Figura 5), a comunidade do solo (BS) apresenta maior proximidade com a Rizosfera da zona de ramificação (SR2), enquanto a RT1 é a mais distante das demais comunidades na matriz.

A análise dos dados sequenciados por metabarcoding da região ITS2 do genoma fúngico identificou, após filtragem de qualidade, correção de erros e remoção de sequências quiméricas, 1.065 ASVs fúngicas. O número de leituras (*reads*) presentes em cada amostra ,ao início e ao final do processamento ,encontra-se descrito no Apêndice A – Tabela 2.

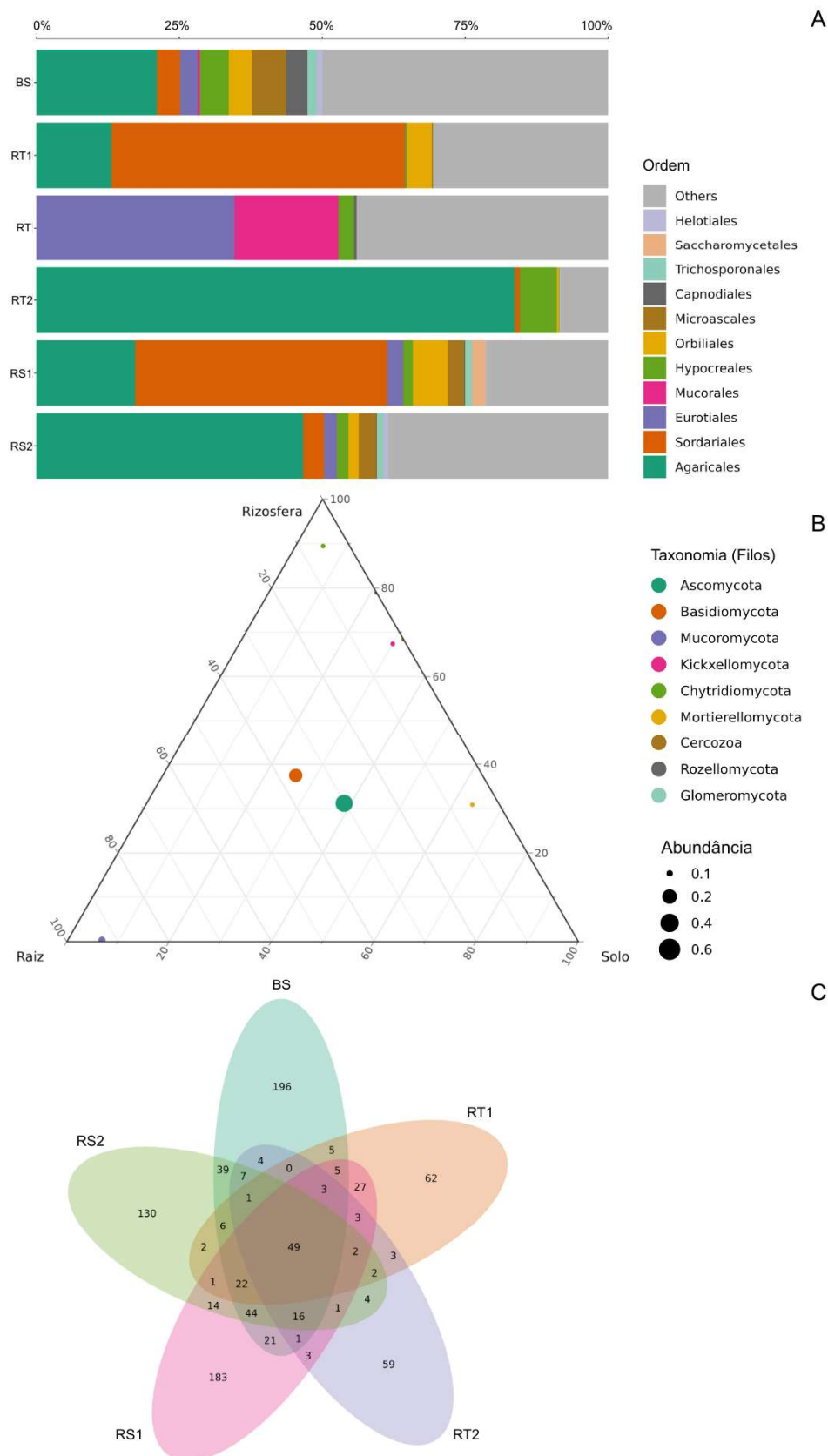


Figura 22. Abundância relativa das dez ordens de fungos mais abundantes em cada compartimento analisado (I). Influência de cada zona do eixo solo-planta na distribuição dos 10 filos

de fungos mais abundantes observados (II). O diagrama de Venn destaca o número de táxons exclusivos e compartilhados em cada compartimento (III).

Dentre as dez ordens de fungos mais abundantes em todo o sistema, Agaricales foi a mais expressiva em BS e nos compartimentos da zona de ramificação (RT2 e SR2). RT0 por sua vez, — o único compartimento que não contém a ordem Agaricales — apresentou 30% de abundância relativa de Eriotiales e pouco menos de 25% de abundância de Mucorales. Além destes, os Hypocreales e os Microascales, somados, representam menos de 5% do total. Já nos compartimentos relativos à zona 1, houve predominância de Sordariales, que ocuparam 50% da abundância relativa de RT1 e 40% de RS1. A ordem Trichosporonales estava presente nos compartimentos de solo - BS, SR1 e SR2, enquanto Microascales estava ausente nos compartimentos RT1 e RT2. Assim como observado na Figura 5, o solo apresentou a distribuição mais regular de táxons, embora seja dominado por Agaricales (~18%). Neste compartimento, Saccharomycetales foi a única ordem ausente dentre as 10 mais abundantes, exclusiva de SR1 (Figura 20-I).

Ascomycota e Basidiomycota foram os filos mais abundantes em todo o sistema; sua posição centralizada no diagrama de pirâmide indica que não há influência significativa de uma ou duas regiões. Mucoromycota por sua vez, tem sua presença fortemente associada à raiz (>90% de influência), enquanto Chytridiomycota (90%) e Kickxellomycota, tendem à rizosfera (com 90% e 70% de influência, respectivamente). O filo Mortierellomycota, cuja distribuição não perpassa os compartimentos de raiz, localiza-se entre o solo (60%) e a rizosfera (40%) (Figura 20-II).

O solo apresenta o maior número de espécies (196) exclusivas (196) na análise apresentada no diagrama de Venn. Em seguida, vêm as rizosferas, com 183 espécies exclusivas em SR1 e 130 em SR2 — padrão oposto ao observado em espécies bacterianas. Os menores números de táxons exclusivos estão nas raízes, um padrão que se repete — 62 em RT1 e 59 em RT2, com apenas 3 compartilhados. No total, 49 espécies de fungos são compartilhadas entre todos os compartimentos (Figura 20-III).

7. Discussão

O contraste entre as metodologias empregadas neste trabalho evidencia o que é sistematicamente ocultado quando se trabalha com abordagens clássicas de cultivo: a fração não-culturável. Ela abriga um enorme conjunto de bactérias e fungos organizados em comunidades complexas e ocupando nichos ecológicos específicos. Em muitos casos, classificamos um microrganismo como não culturável simplesmente por não conseguirmos recuperá-lo em meios ricos ou seletivos, ainda que estes simulem parte de seu habitat e forneçam os substratos necessários ao crescimento; no entanto, deve-se levar em consideração que a própria comunidade em que esse microrganismo está inserido - bem como as interações ali presentes - constitui um componente essencial para o seu crescimento e estabelecimento. A obtenção de microrganismos isolados continua sendo uma etapa central e de suma importância na produção de bioinoculantes para a agricultura, porém, tais protocolos não capturam a complexidade presente em um microbioma. Diante deste cenário, a ecologia microbiana se dispõe como forte aliada da biotecnologia para dar passos mais longos no campo da produção de bioinsumos de nova geração e de diagnósticos agrícolas mais precisos.

A aplicação do índice ecológico de diversidade de Shannon aos compartimentos preditos mostrou um padrão compartilhado entre bactérias e fungos, no qual o solo à granel apresentou os maiores valores de diversidade, seguido pelas rizosferas (RS1 e RS2), enquanto os tecidos radiculares (RT1 e RT2) apresentaram os menores índices. Esse resultado é corroborado pela distribuição mais equilibrada das ordens taxonômicas observada no solo à granel (Figuras 5 e 7), indicando uma comunidade menos dominada por poucos grupos.

Esse padrão decorre do fato de que o solo é reconhecidamente o maior reservatório de diversidade biológica terrestre (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992), funcionando como uma fonte heterogênea de microrganismos aptos a colonizar compartimentos associados às raízes, em função de suas predileções metabólicas e de processos de seleção (HARTMAN et al., 2009; HELGASON & FITTER, 2009). O solo à granel possui uma dinâmica própria, com microbiota característica, desenvolvida em função da formação desse solo e de suas atividades. A

germinação de uma planta pouco modifica a composição dessa microbiota, tendo em vista a comparação entre a riqueza e diversidade de táxons entre BS e TG, e levando ainda em consideração que parte desses táxons será suprimida por outros que já dominam o solo. A grande perturbação causada pela raiz reside em sua arquitetura e movimentação física por meio dos estratos do solo (GALINDO-CASTAÑEDA et al., 2022) e, principalmente, na produção e secreção de metabólitos consolidadas durante o processo de rizodeposição (LI et al., 2024; LIU et al., 2024).

A transição do solo para a rizosfera é mediada, em grande parte, por esse diálogo molecular entre compostos e sinais (SRIVASTAVA et al., 2025). Esses compostos, capazes de atrair microrganismos específicos por quimiotaxia, favorecem a colonização de grupos com maior afinidade metabólica pelos exsudatos ali liberados (BAIS et al., 2006; BADRI; VIVANCO, 2009). Dessa forma, a presença da raiz impõe uma pressão de seleção no solo ao redor, impulsionando a mobilização da microbiota adjacente (GARCIA et al., 2022).

A rizosfera - aqui representada como um ambiente de atividade e diversidade intermediária - reflete um ambiente em que ocorre o recrutamento de alguns táxons mediante a exclusão de outros. E aqueles que se estabelecem ali e almejam chegar ao rizoplaneo devem ser capazes de explorar eficientemente os recursos da rizodeposição e de ultrapassar as barreiras físicas e imunológicas impostas pela planta hospedeira (MENGISTU et al., 2020). Esses microrganismos que se estabelecem no rizoplaneo, por vezes, suprimem o crescimento de grupos menos competitivos (PHILIPPOT et al., 2013).

Esse cenário leva à dicotomia observada entre a contagem (UFC/g) e metodologias que mensuram atividade, como FDA e AWCD (Ecoplaca) Assim como o observado por ABEDINAZADEH; ETESAMI & ALIKHANI (2019), o solo dispõe de um maior número de UFCs, e é possível que isso se explique pela amostragem de uma microbiota abundante e heterogênea, que para chegar ao rizoplaneo, passa por um funil em função de suas especificidades metabólicas e reduz em riqueza e diversidade (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2004). Em ambientes

competitivos, como a rizosfera, capazes de impulsionar a atividade de microrganismos afins ao cenário apresentado, o índice de riqueza de Chao1 mostrou-se uma análise precisa para confirmar o que foi apresentado, levando em consideração até mesmo a presença de espécies de baixa abundância, cuja presença pode ser mascarada por grupos dominantes (SUN et al., 2022).

A respeito dos compartimentos radiculares, a redução do TCC em Formazan (BROWN et al., 2013) sugere que as regiões de emissão de raízes laterais em RT2, assim como a coifa em RT1, são preferidas para a adesão microbiana. Essas regiões são comumente descritas como ambientes propícios ao estabelecimento de microrganismos no rizoplane, ou mesmo nas rizosferas adjacentes, visto que os compostos secretados pelas coifas (tanto principais quanto laterais) são alvo metabólico de muitos microrganismos do solo (COMPANT et al., 2005; MERCADO-BLANCO & PRIETO et al., 2012). Mas também, essas regiões são estratégicas para a colonização do interior da raiz por microrganismos endofíticos benéficos ou mesmo patogênicos (BARBOSA et al., 2015).

A expressão diferencial de genes soma-se às peculiaridades topográficas, resultando na formação de perfis distintos em esses compartimentos. O conjunto dos genes mais expressos em RT1 envolve intensa produção de transcritos envolvidos na fabricação de proteínas ribossômicas (L31, S27a) e fatores relacionados à tradução de novas proteínas (eIF4G) (MARTINEZ-SEIDEL et al., 2021; ZHAO et al., 2017), bem como PIF1 helicase - ligada à replicação de DNA - além de pectinases e β -galactosidases que atuam no remodelamento de paredes celulares (SEDDIGH & DARABI, 2014; YADAV et al., 2023) elementos típicos de regiões meristemáticas onde ocorre intensa divisão e alongamento celular, e eventos de abertura e reparo no DNA e produção de proteínas são requeridos (VERNEKAR et al., 2021). Isso ocorre ao passo que a proteção contra desidratação é mediada pela expressão de ERD4 e a proteção contra patógenos advém de proteínas NB-ARC/TIR-NBS-LRR (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; TAMELING & BAULCOMBE, 2007).

Em RT2, o cenário é diferente: o conjunto de genes mais expressos permite inferir que o foco da região é a produção de pelos radiculares, devido à alta expressão de "Root hair specific 16", de β -galactosidases 3 e de pectinases (KIM et al., 2006). Acompanhada pela extrusão de prótons e transporte de CO₂ pela proteína tipo-CemA, o que permite inferir sobre a capacidade de acidificar a rizosfera facilitando a aquisição de nutrientes, e consequentemente atraindo grupos mais acidófilos (OGAWAAB, KATOHB & SONODA, 2012; KUNZ et al., 2024;). Outras, como MtN21 e permeases, indicam elevada atividade de transporte de aminoácidos. A produção de terpenos por Terpeno-Sintases é outro aspecto que pode influenciar a mediação da relação planta-microrganismo, atraindo benéficos ou repelindo patógenos (HUANG et al., 2019). Ainda, a expressão de NADP-ME 4 indica maior manutenção do potencial oxidorredutor nesta região, que pode estar envolvida na mitigação de estresses (CHEN et al., 2019) e cuja superexpressão pode ser induzida por microrganismos (WANG et al., 2021).

A distribuição diferencial de genes associados à biossíntese de flavonoides e isoflavonoides ao longo dos compartimentos radiculares sugere uma regulação espacial dessas vias metabólicas, reforçando a ideia de uma organização funcional da raiz em compartimentos. Em soja, flavonoides e isoflavonoides são metabólitos especializados fortemente associados à comunicação com microrganismos na rizosfera (WANG; LI & LUO, 2024) e à resposta a estresses (SHOMALI et al., 2022), e sua biossíntese pode variar conforme o tecido e o estágio de desenvolvimento radicular (SUGIYAMA et al., 2017). A presença de enzimas relacionadas à modificação de flavonoides, como beta-glicosidases, sugere não apenas a síntese, mas também a transformação ativa desses compostos (KUMAR et al., 2023). Esse processo pode alterar a solubilidade, a estabilidade e a disponibilidade biológica desses metabólitos no ambiente rizosférico, influenciando sua função como moléculas de sinalização e a interação com microrganismos (LYU et al., 2022).

A maior expressão de genes da fosfoenolpiruvato carboxilase em RT1 sugere maior formação de oxaloacetato na coifa. Como a PEPC fornece carbono para a síntese de malato e de outros ácidos orgânicos (O'LEARY; PARK & PLAXTON, 2011), este padrão também indica maior potencial para o acúmulo ou a produção desses

intermediários do metabolismo do carbono na coifa e na zona de alongamento. Como esses compostos podem ser exsudados pelas raízes (MARIANO et al., 2005; UPADHYAY et al., 2022) e influenciar o recrutamento de microrganismos com certo grau de especificidade (KU et al., 2025), a concentração de sua maquinaria biossintética em RT1 sugere que essa região pode atuar como um importante centro de exsudação e de comunicação com a rizosfera. Por outro lado, a predominância de genes relacionados à citrato sintase em RT2 pode indicar maior direcionamento do fluxo de carbono para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos nessa região (MOREIRA et al., 2019; XU et al., 2010). O citrato é especialmente relevante na rizosfera por atuar na mobilização de nutrientes, sobretudo em baixa disponibilidade de fósforo (VENGAVASI et al., 2017; SAKIB et al., 2025). A distribuição mais homogênea de genes associados à síntese de sacarose e de amido ao longo da raiz sugere que processos ligados ao transporte, armazenamento e redistribuição de fontes de carbono relacionadas à reserva energética (DU et al., 2020; BELLALLOUI et al., 2023) ocorrem de forma mais generalizada ao longo da raiz.

Essas distinções entre os compartimentos refletem-se no posicionamento de RT1 e RT2 observado na Figura 12, em que o gradiente basal-apical os distancia no PCA, enquanto a raiz total (CR) surge como a combinação dessas zonas de expressão distintas para a formação de uma raiz funcional e completa.

As diferenças na composição microbiana e na expressão gênica entre os compartimentos radiculares não se refletiram na diversidade de substratos metabolizados nas ecoplacas, uma vez que o consumo extenso das fontes de carbono resultou em valores semelhantes de equitabilidade e diversidade. Ainda assim, esses índices foram superiores aos observados em solos cultivados com soja em outras regiões (ADAMS et al., 2017; CHINTHALAPUDI et al., 2023), reforçando que o tipo de solo e a localização geográfica exercem forte influência sobre a atividade microbiana, como destacado por GEBAUER et al. (2021). O aspecto mais marcante, entretanto, foi a variação na taxa de consumo entre os compartimentos. RT1 apresentou o menor desempenho, embora os valores se assemelhem aos de solos fertilizados, em que se observa intensa atividade microbiana (CHINTHALAPUDI et al., 2023), enquanto RS2 se destacou pela maior

eficiência no uso de substratos, incluindo o α -cetoglutárico, não assimilado pelos demais compartimentos. A maior proficiência nutricional das rizosferas em relação aos seus respectivos tecidos radiculares sugere diferenças horizontais no eixo que decorrem de comunidades distintas associadas à exsudação modulada pelo estado nutricional da planta (YANG & CROWLEY, 2000), entre outros fatores, que ampliam as capacidades catabólicas na rizosfera — efeito que tende a se intensificar ao longo do tempo (BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2002).

A respeito da variação vertical ao longo do eixo radicular, outros dados ajudam a explicar o sucesso metabólico de RS2 e RT2. A região de emissão de pelos radiculares, ligada à intensa mobilização de nutrientes e água pela raiz (GIEHL & VON-WIRÉN, 2014), aumenta a exsudação e a extensão espacial da rizosfera, favorecendo interações microbianas e a ciclagem de nutrientes em maior volume de solo (HOLZ et al.), além de atuar como sítio preferencial de recrutamento microbiano e de maior riqueza taxonômica (SALEEM et al., 2018). Em contraste, o ápice radicular (RT1), caracterizado por intensa renovação celular e pela remoção de células mortas por apoptose, constitui um ambiente estruturalmente instável para a colonização (CHARURA et al. 2024). A produção de mucilagem pela coifa, rica em peptídeos antimicrobianos, adiciona um componente de controle populacional que pode restringir o estabelecimento microbiano (DRIOUICH et al., 2021). Assim, a estruturação das comunidades e seu desempenho funcional parecem resultar da interação entre processos “bottom-up”, mediados pela disponibilidade de recursos e exsudatos, e “top-down”, associados ao controle biológico e sinais derivados da raiz (BONKOWSKI et al., 2021).

8. Conclusões

Por meio da análise do conjunto de resultados deste trabalho, é possível confirmar a hipótese inicial de compartimentação. Para tal, o solo representa uma fonte fecunda de microrganismos, genes e funções, nesse cenário, o pleno desenvolvimento de uma raiz pivotante interfere na dinâmica microbiana de um

solo-à-granel e dá início à uma corrida por recursos protagonizada pela microbiota edáfica.

À partir desse contexto, as especificidades funcionais microbianas se somam à estratificação do solo e à anatomia radicular produzindo compartimentos (I) Estrutural e fisiologicamente distintos, capazes de influenciar o meio externo e produzir nichos ecológicos; (II) Comunidades diferentes, recrutadas para esses nichos e contendo espécies que interagem entre si facilitando ou dificultando esse estabelecimento; e (III) metabolismo e perfil funcional distinto, resultado da diversidade genética e fenotípica oriundas da soma dos dois primeiros itens.

9. Perspectivas Futuras

Os próximos passos a serem dados a partir deste trabalho englobam (I) a testagem dos microrganismos isolados de cada compartimento para características de interesse biotecnológico — como potencial de promoção do crescimento vegetal, produção de compostos de interesse biotecnológico e potencial antagonico/biocontrole; (II) a elaboração de meios para o cultivo e o armazenamento das comunidades coletadas diretamente de cada compartimento. E (III) Uma exploração mais profunda do transcriptoma, em busca de mais GDEs associados à interação micro-organismo-planta.

Ademais, objetiva-se somar os resultados deste trabalho aos demais trabalhos do grupo, elaborados a partir da perspectiva da teoria dos compartimentos, utilizando outras culturas vegetais, a fim de identificar padrões e especificidades da colonização e da atividade microbiana em plantas de interesse agrícola.

Com isso, este trabalho poderá contribuir para outros trabalhos do grupo e da sociedade científica em geral, atraídos pela prospecção de microrganismos com características de interesse ou pela interação destes com determinados substratos, o que é relevante para o desenvolvimento de ensaios e tecnologias para a agricultura.

10. Referências Bibliográficas

ADAMS, Taylor C. et al. Microbial carbon substrate utilization differences among high-and average-yield soybean areas. **Agriculture**, v. 7, n. 6, p. 48, 2017.

AHMED, Engy; HOLMSTRÖM, Sara JM. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196-208, 2014.

ABEDINZADEH, Motahhareh; ETESAMI, Hassan; ALIKHANI, Hossein Ali. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00305, 2019.

BALDANI, José Ivo et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014.

BAUDOIN, Ezekiel; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. **Applied Soil Ecology**, v. 19, n. 2, p. 135-145, 2002.

BELLALLOUI, Nacer et al. Soybean Seed Sugars: A role in the mechanism of resistance to charcoal rot and potential use as biomarkers in selection. **Plants**, v. 12, n. 2, p. 392, 2023.

BERG, Gabriele et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, p. 1-22, 2020.

BERRAQUERO, F. Ruiz; BAYA, Ana M^a; CORMENZANA, A. Ramos. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

BIORENDER, *BioRender*. Disponível em: <https://biorender.com>. Acesso em: 18 mar. 2026.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOKULICH, Nicholas A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 2018.

BONKOWSKI, Michael et al. Spatiotemporal dynamics of maize (*Zea mays* L.) root growth and its potential consequences for the assembly of the rhizosphere microbiota. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 619499, 2021.

BORO, Manswama et al. Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 11, p. 666, 2022.

BOYLE, Julia A. et al. Resistance and resilience of soil microbiomes under climate change. **Ecosphere**, v. 15, n. 12, p. e70077, 2024.

BROWN, H. L. et al. Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in a food matrix model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 5, p. 1212-1221, 2013.

CANELLAS, Luciano P.; OLIVARES, Fábio L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 1-11, 2014.

CANVA. *Canva: design gráfico para todos*. Disponível em: www.canva.com. Acesso em: 18 mar. 2026.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, Siu Mui; NEVES, Maria Cristina Prata. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

CHARURA, Nyasha et al. Root cap cell corpse clearance limits microbial colonization in *Arabidopsis thaliana*. **Elife**, v. 13, p. RP96266, 2024.

CHEN, Qiqi et al. The role of NADP-malic enzyme in plants under stress. **Plant science**, v. 281, p. 206-212, 2019.

CHENG, Shifeng et al. Genomes of subaerial Zygnematophyceae provide insights into land plant evolution. **Cell**, v. 179, n. 5, p. 1057-1067. e14, 2019.

CHINTHALAPUDI, Durga PM et al. Exploring the synergistic impacts of cover crops and fertilization on soil microbial metabolic diversity in dryland soybean production systems using biolog EcoPlates. **Applied Biosciences**, v. 2, n. 3, p. 328-346, 2023.

CHOI, Keun-Hyung; DOBBS, Fred C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. **Journal of microbiological methods**, v. 36, n. 3, p. 203-213, 1999.

DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. 1995.

DRIOUICH, Azeddine et al. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 4, p. 489-495, 2013.

DRIOUICH, Azeddine et al. Root cap–derived cells and mucilage: a protective network at the root tip. **Protoplasma**, v. 258, n. 6, p. 1179-1185, 2021.

DU, Yanli et al. Effect of drought stress during soybean R2–R6 growth stages on sucrose metabolism in leaf and seed. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 618, 2020.

DWIBEDI, Vagish et al. Microbial endophytes: application towards sustainable agriculture and food security. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 17, p. 5359-5384, 2022.

GALINDO-CASTAÑEDA, Tania et al. Improving soil resource uptake by plants through capitalizing on synergies between root architecture and anatomy and root-associated microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 827369, 2022.

GARAU, Giovanni et al. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. **Geoderma**, v. 142, n. 1-2, p. 47-57, 2007.

GARCIA, Joshua et al. Selection pressure on the rhizosphere microbiome can alter nitrogen use efficiency and seed yield in Brassica rapa—**Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 959, 2022.

GARLAND, Jay L.; MILLS, Aaron L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2351-2359, 1991.

GEBAUER, L. et al. Soil texture, sampling depth and root hairs shape the structure of ACC deaminase bacterial community composition in maize rhizosphere. *F Microbiol* 12: 616828. **New Phytol**, v. 203, p. 195-205, 2021.

GLICK, Bernard R.; GAMALERO, Elisa. Recent developments in the study of plant microbiomes. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1533, 2021.

HAQ, Irshad UI et al. The interactions of bacteria with fungi in soil: emerging concepts. **Advances in applied microbiology**, v. 89, p. 185-215, 2014.

HARTMANN, Anton et al. Plant-driven selection of microbes. 2009.

HELGASON, Thorunn; FITTER, Alastair H. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 9, p. 2465-2480, 2009.

HOLZ, Maire et al. Root hairs increase rhizosphere extension and carbon input to soil. **Annals of Botany**, v. 121, n. 1, p. 61-69, 2018.

HUANG, Ancheng C. et al. A specialized metabolic network selectively modulates Arabidopsis root microbiota. **Science**, v. 364, n. 6440, p. eaau6389, 2019.

HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antonio. Fixação biológica do nitrogênio. 2022.

INSAM, Heribert. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. **Microbial communities: functional versus structural approaches**, p. 259-260, 1997.

JIANG, Yutong; HOU, Lijun; DING, Fang; WHALEN, Joann K. Root mucilage: chemistry and functions in soil. In: SPARKS, Donald L. (Ed.). **Encyclopedia of soils in the environment**. 2nd ed. Sainte-Anne-de-Bellevue, QC: Elsevier Cap. 171. 2022.

KASETTY, Swetha et al. Both *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* accumulate greater biomass in dual-species biofilms under flow. **Msphere**, v. 6, n. 3, p. 10.1128/msphere. 00416-21, 2021.

KIM, Daehwan; LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, v. 12, n. 4, p. 357-360, 2015.

KIM, Dong Wook et al. Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. **The Plant Cell**, v. 18, n. 11, p. 2958-2970, 2006.

KOLDE, Raivo; KOLDE, Maintainer Raivo. Package 'pheatmap'. **R package**, v. 1, n. 7, p. 790, 2015.

KRANAWETTER, Clayton et al. A *Medicago truncatula* metabolite atlas enables the visualization of differential accumulation of metabolites in root tissues. **Metabolites**, v. 11, n. 4, p. 238, 2021.

KUMAR, Sandeep et al. Soybean (*Glycine max*) isoflavone conjugate hydrolysing β -glucosidase (Gm ICHG): A promising candidate for soy isoflavone bioavailability enhancement. **3 Biotech**, v. 13, n. 2, p. 52, 2023.

KUMPF, Robert P.; NOWACK, Moritz K. The root cap: a short story of life and death. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 19, p. 5651-5662, 2015.

KUNZ, Hans-Henning et al. Chloroplast ion homeostasis—what do we know and where should we go?. **New Phytologist**, v. 243, n. 2, p. 543-559, 2024.

LI, Haoye et al. Diverse factors influence the amounts of carbon input to soils via rhizodeposition in plants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 948, p. 174858, 2024.

LI, Heng et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. **bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009.

LIU, Chi et al. microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. **FEMS microbiology ecology**, v. 97, n. 2, p. fiae255, 2021.

LIU, Jinhua et al. Unraveling the influence of litter identity, diversity and rhizodeposition on nematode communities. **Plant and Soil**, v. 505, n. 1, p. 763-777, 2024.

LIU, Yingjie et al. Two ecological rules behind randomness in microbiome associated with pepper (*Capsicum annuum*) root. **Plant and Soil**, v. 512, n. 1, p. 947-962, 2025.

LUNDBERG, Derek S. et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 999-1002, 2013.

LYU, Dongmei et al. The coevolution of plants and microbes underpins sustainable agriculture. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1036, 2021.

LYU, Xiaochen et al. Systemic regulation of soybean nodulation and nitrogen fixation by nitrogen via isoflavones. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 968496, 2022.

MARIANO, Eduardo D. et al. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 157-172, 2005.

MARTINEZ-SEIDEL, Federico et al. Membrane-enriched proteomics link ribosome accumulation and proteome reprogramming with cold acclimation in barley root meristems. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 656683, 2021.

MARTIN, Marcel. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet. journal**, v. 17, n. 1, p. 10-12, 2011.

MCMURDIE, PAUL J.; HOLMES, Susan. Phyloseq: a bioconductor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. In: **Biocomputing 2012**. 2012. p. 235-246.

MENGISTU, Anteneh Ademe. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, n. 1, p. 6927219, 2020.

MOREIRA, Thiago Batista et al. A genome-scale metabolic model of soybean (*Glycine max*) highlights metabolic fluxes in seedlings. **Plant physiology**, v. 180, n. 4, p. 1912-1929, 2019.

NAZARI, Meisam. Plant mucilage components and their functions in the rhizosphere. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100344, 2021.

NEUWIRTH, Erich; NEUWIRTH, Maintainer Erich. Package 'rcolorbrewer'. **ColorBrewer palettes**, v. 991, p. 1296, 2014.

OBURGER, Eva; JONES, David L. Sampling root exudates—mission impossible?. **Rhizosphere**, v. 6, p. 116-133, 2018.

OGAWAAB, Teruo; KATOHB, Akira; SONODA, Masatoshi. Molecular mechanisms of CO₂ concentration and proton extrusion in cyanobacteria. Stress Responses of Photosynthetic Organisms: **Molecular Mechanisms and Molecular Regulations**, p. 181, 2012.

O'LEARY, Brendan; PARK, Joonho; PLAXTON, William C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. **Biochemical Journal**, v. 436, n. 1, p. 15-34, 2011.

PELEG, Anton Y.; HOGAN, Deborah A.; MYLONAKIS, Eleftherios. Medically important bacterial–fungal interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 340-349, 2010.

PHILIPPOT, Laurent et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.

QIU, Xiaoqian et al. Fulvic acid promotes legume–Rhizobium symbiosis by stimulating endogenous flavonoids synthesis and secretion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 6133-6142, 2024.

QUAST, Christian et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

ROSENBLUETH, Mónica; MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza. Rhizobium etli maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of microbiology**, v. 181, n. 5, p. 337-344, 2004.

ROSS, Tyler D. et al. Metabolic interplay drives population cycles in a cross-feeding microbial community. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 8919, 2025.

SALEEM, Muhammad et al. Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome. **Rhizosphere**, v. 6, p. 47-51, 2018.

SAKIB, Tamjid Us et al. Soil phosphorus availability as affected by root exudates of cover crop species. **Scientific reports**, v. 15, n. 1, p. 33443, 2025.

SANTOS, L. A.; REIS, VMA. A formação do nódulo em leguminosas. Embrapa Agrobiologia. Documentos, v. 251, 2008.

SANTOS, Lidiane Figueiredo et al. Altered bacteria community dominance reduces tolerance to resident fungus and seed to seedling growth performance in maize (Zea mays L. var. DKB 177). **Microbiological Research**, v. 243, p. 126643, 2021.

SAXENA, Priti et al. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. **Indian journal of microbiology**, v. 59, n. 1, p. 3-12, 2019.

SEDDIGH, Samin; DARABI, Maryam. Comprehensive analysis of beta-galactosidase protein in plants based on Arabidopsis thaliana. **Turkish Journal of Biology**, v. 38, n. 1, p. 140-150, 2014.

SHARMA, Arun Kumar et al. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil. **Int J Sci Res Environ Sci**, v. 3, n. 9, p. 0334-0340, 2015.

SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SHOMALI, Aida et al. Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3158, 2022.

SOFO, Adriano; MININNI, Alba Nicoletta; RICCIUTI, Patrizia. Comparing the effects of soil fauna on litter decomposition and organic matter turnover in sustainably and conventionally managed olive orchards. **Geoderma**, v. 372, p. 114393, 2020.

SRIVASTAVA, Ashish K. et al. Unravelling the molecular dialogue of beneficial microbe– plant interactions. **Plant, Cell & Environment**, v. 48, n. 4, p. 2534-2548, 2025.

SUGIYAMA, Akifumi et al. Synthesis and secretion of isoflavones by field-grown soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 9, p. 1594-1600, 2017.

SUMAN, Jarupula et al. Microbiome as a key player in sustainable agriculture and human health. **Frontiers in Soil Science**, v. 2, p. 821589, 2022.

SUN, Zhencai et al. The use of manure shifts the response of α -diversity and network while not β -diversity of soil microbes to altered irrigation regimes. **Applied Soil Ecology**, v. 174, p. 104423, 2022.

SWISHER, Ronald; CARROLL, George C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial ecology**, v. 6, p. 217-226, 1980.

TAMELING, Wladimir IL; BAULCOMBE, David C. Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a Ran GTPase–activating protein is required for

extreme resistance to Potato virus X. **The Plant Cell**, v. 19, n. 5, p. 1682-1694, 2007.

TEAM, R. Core. R language definition. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing, v. 3, n. 1, p. 116, 2000.

UPADHYAY, Sudhir K. et al. Root exudates: mechanistic insight of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable crop production. **Frontiers in microbiology**, v. 13, p. 916488, 2022.

VASSE, Jacques; FREY, Pascal; TRIGALET, Andre. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 8, n. 2, p. 241-251, 1995.

VENGAVASI, Krishnapriya et al. Comparative analysis of soybean root proteome reveals molecular basis of differential carboxylate efflux under low phosphorus stress. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 341, 2017.

VERNEKAR, Dipti Vinayak et al. The Pif1 helicase is actively inhibited during meiotic recombination which restrains gene conversion tract length. **Nucleic acids research**, v. 49, n. 8, p. 4522-4533, 2021.

VOYTAS, Daniel. Agarose gel electrophoresis. Current protocols in molecular biology, v. 51, n. 1, p. 2.5 A. 1-2.5 A. 9, 2000.

WANG, Lijun; LI, Chaofeng; LUO, Keming. Biosynthesis and metabolic engineering of isoflavonoids in model plants and crops: a review. **Frontiers in plant science**, v. 15, p. 1384091, 2024.

WANG, Yu et al. Auxin is involved in arbuscular mycorrhizal fungi-promoted tomato growth and NADP-malic enzymes expression in continuous cropping substrates. **BMC plant biology**, v. 21, n. 1, p. 48, 2021.

WANG, Zhongwen; SHAN, Xiao-quan; ZHANG, Shuzhen. Comparison between fractionation and bioavailability of trace elements in rhizosphere and bulk soils. **Chemosphere**, v. 46, n. 8, p. 1163-1171, 2002.

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

YADAV, Kanchan et al. Recent insights into microbial pectin lyases: a review. **Process Biochemistry**, v. 134, p. 199-217, 2023.

YANG, Ching-Hong; CROWLEY, David E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 345-351, 2000.

XU, Muyun et al. Mitochondrial enzymes and citrate transporter contribute to the aluminium-induced citrate secretion from soybean (*Glycine max*) roots. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 4, p. 285-295, 2010.

YUAN, Wei et al. Relationship between vegetation restoration and soil microbial characteristics in degraded karst regions: a case study. **Pedosphere**, v. 21, n. 1, p. 132-138, 2011.

ZHANG, Chi et al. Spatial metabolome mass spectrometry imaging reveals the flavonoid distribution change in soybean nodules under drought and alkaline stresses. **Plant Stress**, p. 100880, 2025.

ZHAO, Pei et al. Eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) coordinates interactions with eIF4A, eIF4B, and eIF4E in binding and translation of the barley yellow dwarf virus 3' cap-independent translation element (BTE). **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 14, p. 5921-5931, 2017.

APÊNDICE A

Tabela 3. Identificação das amostras e do número de reads no início (input) e ao final do processamento bioinformático (não quiméricos), seguida da porcentagem de retenção de leituras.

Gene ID	Input	Não-Quiméricos (NQ)	NQ/Input (%)
V4-BS 1	110683	80428	73%
V4-BS 2	85758	61330	72%
V4-BS 3	101669	72711	72%
V4-BS 4	105563	75961	72%
V4-RS1 1	66674	48825	73%
V4-RS1 2	123108	90640	74%
V4-RS1 3	105090	76922	73%
V4-RS1 4	81616	59550	73%
V4-RS2 1	69040	48950	71%
V4-RS2 2	100022	71804	72%
V4-RS2 3	98332	70460	72%
V4-RS2 4	95691	67832	71%
V4-RT1 1	86966	63376	73%
V4-RT1 2	93216	68780	74%
V4-RT1 3	115292	85108	74%
V4-RT1 4	104154	77063	74%
V4-RT 1	83644	62479	75%
V4-RT 2	95372	70722	74%
V4-RT 3	106538	78369	74%
V4-RT 4	87310	64463	74%
V4-RT2 1	92804	67261	72%
V4-RT2 2	100237	73529	73%
V4-RT2 3	91386	67767	74%
V4-RT2 4	88294	64962	74%

Tabela 4. Identificação das amostras e do número de reads no início (input) e ao final do processamento bioinformático (non-chimeric), seguida da porcentagem de retenção de leituras.

Gene ID	Input	Não-Quiméricos (NC)	NC/Input (%)
ITS-BS1	131971	90167	68%
ITS-BS2	110044	71603	65%
ITS-BS3	133255	90904	68%
ITS-BS4	124685	80806	65%
ITS-RT1 1	130025	101129	78%
ITS-RT1 2	112179	86884	77%
ITS-RT1 3	117539	91891	78%
ITS-RT1 4	117168	90462	77%
ITS-RT 1	116120	91666	79%
ITS-RT 2	116104	91884	79%
ITS-RT 3	137040	109075	80%
ITS-RT 4	122834	98123	80%
ITS-RT2 1	87560	68952	79%
ITS-RT2 2	93615	73175	78%
ITS-RT2 3	75730	59916	79%
ITS-RT2 4	101441	80308	79%
ITS-SR1 1	111507	85308	77%
ITS-SR1 2	126059	93882	74%
ITS-SR1 3	102299	74357	73%
ITS-SR1 4	119840	78170	65%
ITS-SR2 1	105279	76267	72%
ITS-SR2 2	103795	70057	67%
ITS-SR2 3	101456	72677	72%
ITS-SR2 4	106848	74982	70%

Tabela 5. Estatísticas do sequenciamento RNA-seq e resultados de mapeamento das amostras, incluindo o número total de reads (Total Reads), reads mapeados ao genoma de referência (Mapped Reads), reads mapeados de forma única (Uniq Mapped Reads), reads com múltiplos alinhamentos (Multiple Map Reads) e o conteúdo de guanina e citosina (GC %).

Amostra	Total reads	Mapped reads	Uniq Mapped Reads	Multiple Mapped Reads	GC (%)
RT1 1	29.165.190	28240653 (96.83%)	26735613 (91.67%)	833836 (2.86%)	44%
RT1 2	21.154.516	20475456 (96.79%)	18206294 (86.06%)	1214920 (5.74%)	44%
RT1 3	25.348.020	24511535 (96.70%)	20778651 (81.97%)	2405014 (9.49%)	45%
RT1 4	26.385.280	25453879 (96.47%)	21307120 (80.75%)	2254778 (8.55%)	45%
CR 1	30.668.782	29626043 (96.60%)	26476655 (86.33%)	1079222 (3.52%)	43%
CR 2	22.611.636	21790833 (96.37%)	19502601 (86.25%)	1092093 (4.83%)	44%
CR 3	23.921.716	23012690 (96.20%)	20999382 (87.78%)	938163 (3.92%)	44%
CR 4	30.676.155	29513528 (96.21%)	26589498 (86.68%)	1346009 (4.39%)	44%
RT2 1	26.203.570	25296926 (96.54%)	22221248 (84.80%)	1460331 (5.57%)	44%
RT2 2	26.409.207	25574676 (96.84%)	22833090 (86.46%)	1210084 (4.58%)	44%
RT2 3	29.667.177	28738594 (96.87%)	26009898 (87.67%)	1083823 (3.65%)	43%
RT2 4	22.869.323	22153513 (96.87%)	19683956 (86.07%)	920883 (4.03%)	44%