

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

GABRIEL SILVESTRE ROCHA

**Composição do microbioma em variedades de *Urochloa* associado à
disponibilidade de fósforo na restauração de solos degradados de pastagem**

Piracicaba - SP

2023

GABRIEL SILVESTRE ROCHA

**Composição do microbioma em variedades de *Urochloa* associado à
disponibilidade de fósforo na restauração de solos degradados de pastagem
Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Dissertação apresentada ao Centro de energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientadora: Profa. Dra. Tsai Siu Mui

Piracicaba – SP

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Rocha, Gabriel Silvestre

Composição do microbioma em variedades de Urochloa associado à disponibilidade de fósforo na restauração de solos degradados de pastagem / Gabriel Silvestre Rocha; Tsai Siu Mui. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

63 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Biomassa 2. Brachiaria 3. Ciclos biogeoquímicos 4. Ecologia microbiana
5. Manejo de pastagens 6. Melhoramento genético vegetal 7. Metagenômica
8. Microbiologia do solo. I. Título.

CDU 574.4 : (633.2.033 + 631.52)

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer imensamente todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa, principalmente ao Luis Merlotti, que me auxiliou com a pesquisa desde seu início.

À minha orientadora Professora Dr^a Tsai Siu Mui, por acolher e cuidar, além de sempre apoiar e incentivar os alunos.

Um agradecimento especial aos meus amigos, que fazem os meus dias no laboratório muito mais felizes e produtivos.

Agradeço minha noiva, Luísa da Costa Desgranges, por todo suporte e amor ao longo desses anos.

À minha família, por me apoiarem nas minhas decisões e sempre me oferecerem suporte e incentivo ao longo da jornada acadêmica.

Agradeço ao CENA, por todas as oportunidades oferecidas e toda a estrutura.

Agradeço à UNESP de Botucatu, pela instalação e manutenção do experimento na área experimental da Fazenda Lageado, principalmente ao Prof^o Dr. Carlos Crusciol e ao Dr. João Bossolani por toda a ajuda.

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

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte sob Processo n. 2021/11386-3.

RESUMO

ROCHA, G. S. **Composição do microbioma em variedades de *Urochloa* associado à disponibilidade de fósforo na restauração de solos degradados de pastagem**. 2023. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

O Brasil apresenta números preocupantes de pastagens que exibem algum grau de degradação. Essas áreas, quando não são adequadamente manejadas, frequentemente apresentam uma saúde do solo bastante reduzida, o que resulta no abandono dessas áreas e na abertura de novas, ocasionando perdas de florestas nativas. Um dos principais nutrientes limitantes em solos tropicais é o fósforo (P), e a microbiota do solo desempenha um papel fundamental na ciclagem desse elemento nos solos. As pastagens brasileiras geralmente são compostas por gramíneas do gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*), que possuem um sistema radicular profundo e altamente ativo em termos microbianos. Este estudo teve como objetivo avaliar quatro variedades de *Urochloa*, nomeadamente *U. ruziziensis*, *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* BRS Paiaguás e um híbrido BRS RB331 Ipyporã (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandu) em três profundidades a cada 10 cm, a fim de compreender o impacto do melhoramento dessas gramíneas na comunidade microbiana e como esse impacto influencia o ciclo biogeoquímico do fósforo e as estratégias de obtenção de P pelas plantas, visando identificar as variedades mais adequadas para a recuperação de solos de pastagens degradadas. Por meio de um experimento de campo conduzido em uma área experimental com características de solo semelhantes, as quatro variedades foram cultivadas juntamente com um tratamento controle (solo sem planta) por três anos. Durante um período de baixa precipitação, amostras de solo foram coletadas e submetidas a análises químicas, físicas e biológicas. As frações de fósforo foram avaliadas por meio do fracionamento do elemento, a colonização por fungos micorrízico arbusculares (FMA) foi avaliada, enquanto as comunidades de fungos, bactérias e arqueias foram quantificadas utilizando qPCR. Além disso, genes funcionais relacionados à ciclagem do fósforo (*phoD* e *pqqC*) também foram quantificados, e o sequenciamento metagenômico do DNA do solo foi realizado. Por meio do uso de ferramentas de bioinformática e estatística, foi possível investigar a comunidade microbiana tanto em termos taxonômicos quanto funcionais. Observou-se que as comunidades microbianas do solo foram dominadas por Actinobacteria e Proteobacteria em relação a abundância relativa dos filos. Esses filos bacterianos exercem influência na solubilização e absorção de fósforo pelas plantas, contribuindo para a adaptação dessas às diferentes características do solo. Identificou-se que a variedade BRS Paiaguás apresentou resultados promissores na correlação entre os genes funcionais e a fração de fósforo no solo, o que indica sua adaptabilidade em solos pobres, possuindo uma microbiota reativa a situações de escassez de P. Observou-se efeito da profundidade do solo nos grupos microbianos relacionados à ciclagem do fósforo, demonstrados por meio de uma db-RDA. As diferenças apresentadas pelo Híbrido Ipyporã em relação às demais variedades como a menor diversidade da microbiota e menores níveis de colonização radicular por FMA, indicam que o processo de hibridização apresenta influência na interação da planta com a microbiota do solo, enquanto a variedade BRS Paiaguás demonstrou uma comunidade microbiana potencial mais responsiva à limitação de fósforo. Na análise de co-ocorrências, a interação entre *Pseudomonas* e *Azospirillum* foi observada como uma correlação significativa em todas as redes avaliadas. A interação complexa entre as plantas e a microbiota associada deve ser levada em consideração nos programas de seleção, visando o desenvolvimento de variedades mais eficazes.

Palavras-chave: *Brachiaria*. Metagenômica. Melhoramento genético. Ecologia microbiana.

ABSTRACT

ROCHA, G. S. **Microbiome composition in *Urochloa* varieties associated with phosphorus availability in the restoration of degraded pasture soils.** 2023. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Brazil presents alarming numbers of degraded pastures. These areas, when not properly managed, often have significantly reduced soil health, leading to their abandonment and the opening of new areas, resulting in losses of native forests. One of the main limiting nutrients in tropical soils is phosphorus (P), and the soil microbiota plays a fundamental role in the cycling of this element. Brazilian pastures are usually composed of grasses from the *Urochloa* genus (syn. *Brachiaria*), which have a deep and highly active root system in terms of microbial activity. This study aimed to evaluate four *Urochloa* varieties, namely *U. ruziziensis*, *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* BRS Paiaguás, and a hybrid BRS RB331 Ipyporã (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandu) at three depths each 10 cm. The main objective was to understand the impact of the improvement of these grasses on the microbial community and how this impact influences the biogeochemical cycle of phosphorus and plant phosphorus acquisition strategies and, aiming to identify the most suitable varieties for the recovery of degraded pasture soils. Through a field experiment conducted in an experimental area with similar soil characteristics, the four varieties were cultivated along with a control treatment (bulk soil) for three years. During a period of low precipitation, soil samples were collected and subjected to chemical, physical, and biological analyses. Phosphorus fractions were assessed through element fractionation, while colonization by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was evaluated. Fungal, bacterial, and archaeal communities were quantified using qPCR. In addition, functional genes related to phosphorus cycling (*phoD* and *pqqC*) were also quantified, and metagenomic sequencing of soil DNA was performed. By using bioinformatics and statistical tools, it was possible to investigate the microbial community in relation to both taxonomic and functional profiles and structures. The soil microbial communities were found to be dominated by Actinobacteria and Proteobacteria in relative abundance of phyla. These bacterial phyla influence the solubilization and absorption of phosphorus by plants, contributing to their adaptation to different soil characteristics. It was identified that the variety BRS Paiaguás showed promising results in the correlation between functional genes and phosphorus fraction in the soil, indicating its adaptability to poor soils and possessing a responsive microbiota to phosphorus starvation situations. The impact of soil depth on microbial groups related to phosphorus cycling was observed, demonstrated through the db-RDA. Distinct differences presented by the Hybrid Ipyporã compared to the other varieties, such as lower microbiota diversity and reduced root colonization by AMF, suggest that the hybridization process influences plant-microbiota interactions. In the co-occurrence analyses, the interaction between *Pseudomonas* and *Azospirillum* a significant correlation was observed in all networks. Consequently, the complex interplay between plants and their associated microbiota should be considered in selection programs, with the aim of developing more effective plant varieties.

Keywords: *Brachiaria*. Metagenomics. Plant genetic breeding. Microbial ecology.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
1.1 A disponibilidade do P em solos tropicais	11
1.2 O papel da microbiota na ciclagem do fósforo.....	11
1.3 Breve histórico do melhoramento genético de <i>Urochloa</i> na melhoria de pastagens tropicais	12
2. HIPÓTESE	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Caracterização da área de estudo	16
4.2 Amostragem do Solo	17
4.3 Amostragem de Plantas, Biomassa e Conteúdo de Nutrientes.....	18
4.4 Análise Química e Física do Solo	18
4.5 Análise Enzimática.....	18
4.6 Fracionamento do Fósforo	19
4.7 Colonização de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA).....	19
4.8 Extração de DNA do solo.....	19
4.9 Sequenciamento metagenômico	19
4.10 PCR em tempo real (qPCR) de marcadores genéticos	20
4.11 Análise estatística.....	20
4.12 Análise bioinformática	21
5. RESULTADOS.....	23
5.1 Caracterização biogeoquímica do solo.....	23
5.2 Caracterização metagenômica da comunidade microbiana.....	28
6. DISCUSSÃO.....	36
6.1 Caracterização biogeoquímica do solo.....	36
6.2 Caracterização metagenômica da comunidade microbiana.....	38
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 A disponibilidade do P em solos tropicais

O fósforo (P) é um dos elementos essenciais para a vida, estando presente nos ácidos nucleicos e sendo um dos principais componentes do ATP, atuando assim, em diversas funções metabólicas (MATIOLI; FERNANDES, 2012). Em solos tropicais, o P é um dos principais limitantes para a produção agrícola, estando presente em baixas quantidades no solo (OBERSON et al., 2001) tornando necessário o uso de adubação fosfatada.

O uso de suplementação de fósforo apresenta baixo rendimento, onde mais de 80% dos fertilizantes utilizados ficam retidos nos colóides do solo ou transformados em compostos pouco solúveis, quando ligado aos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, por exemplo (KHAN; ZAIDI; MUSARRAT, 2009; VANCE, 2001; WEIL; BRADY, 2016). Além disso, esse tipo de fertilização advém de uma fonte não renovável (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009), sendo assim, são necessárias formas alternativas para a obtenção de P pelas plantas, de forma sustentável e menos danosa ao ambiente natural.

1.2 O papel da microbiota na ciclagem do fósforo

Os processos de desorção dos minerais do solo e da mineralização do P orgânico (P_o) é mediada por microrganismos, que apresentam diferentes estratégias que possibilitam essa disponibilização (ILLMER; SCHINNER, 1995; HINSINGER, 2001), podendo ocorrer por meio da liberação de enzimas ou por meio da produção de ácidos orgânicos e inorgânicos (CUI et al., 2015; KHAN; ZAIDI; MUSARRAT, 2009; TAN et al., 2013). Duas das principais formas de disponibilização do P são pela liberação de fosfatases e pela secreção de ácido glucônico. As fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster-fosfato (EIVAZI; TABATABAI, 1977), atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina são amplamente utilizadas para a avaliação da qualidade do solo (MENDES; REIS JÚNIOR, 2003; MENDES; SOUSA; REIS JUNIOR, 2015). Já o ácido glucônico atua na solubilização de P inorgânico (P_i) por meio de alterações no pH do solo (AN; MOE, 2016; GOLDSTEIN, 1995).

Os microrganismos, além de auxiliarem na disponibilização de formas menos lábeis de P, atuam também como fontes de P, podendo imobilizar temporariamente o P da solução, evitando perdas do mineral, que posteriormente, pode ser rapidamente disponibilizado a planta (BÜNEMANN, 2015; OLANDER; VITOUSEK, 2004).

Além das bactérias solubilizadoras de fosfato, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) apresentam um importante papel nessa ciclagem. FMA são biotróficos, que por meio da simbiose estabelecida, denominada de micorriza, recebem da planta fotoassimilados e em troca, auxilia na absorção de nutrientes (SMITH; READ, 2008). Por meio de suas hifas extracelulares, conseguem acessar um volume maior de solo, o que é essencial para a aquisição de nutrientes com baixa mobilidade no solo, como é o caso do P (COSTA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2002; POUYU-ROJAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2006). A liberação de enzimas que auxiliam na solubilização de P pelas hifas de FMA já foi observada em outros trabalhos (BENEDETTO et al., 2005; MALDONADO-MENDOZA; DEWBRE; HARRISON, 2001; NAKATANI et al., 2008). Não obstante, FMAs auxiliam na absorção de água e na proteção contra patógenos, além do seu papel no sequestro de carbono pela produção de glomalina (RILLIG et al., 2001).

A rizosfera atua como uma região de alta mobilização de P, pois é onde as plantas liberam exsudatos (compostos orgânicos de baixo e alto peso molecular) que recrutam microrganismos, como bactérias, arqueias e fungos, e estruturam a comunidade microbiana do solo (LEITE et al., 2021). Estudos demonstram a influência dos exsudatos radiculares de diferentes genótipos da mesma planta na composição da comunidade microbiana, podendo alterar a funcionalidade da mesma (LEITE et al., 2021; MENDES et al., 2018; ZHOU et al., 2019; ZHOU; ZHU; YAO, 2018). Essa influência pode ser utilizada para selecionar microrganismos de interesse, pois o estabelecimento da comunidade microbiana pode auxiliar no estabelecimento de plantas que sejam introduzidas posteriormente.

1.3 Melhoramento genético de *Urochloa* na melhoria de pastagens tropicais

Em uma revisão minuciosa Baptistella e colaboradores (2020) demonstraram que variedades de *Urochloa* apresentam diferentes mecanismos que contribuem para a absorção de P, como por exemplo um maior crescimento das raízes, que podem chegar até 1,5 m de profundidade. Além disso, liberam ácidos orgânicos que minimizam a fixação pelos óxidos e hidróxidos do solo, e assim como os microrganismos, aumentam a atividade de enzimas, como a fosfatase, por exemplo (JANEGITZ; INOUE; ROSOLEM, 2013). Também foi possível observar que plantas do gênero *Urochloa* aumentam a quantidade de P microbiano no solo, favorecendo uma imobilização temporária do nutriente, que posteriormente, pode ser facilmente solubilizado (JANEGITZ; ROSOLEM; FERREIRA-ELOY, 2017).

Essas plantas forrageiras são amplamente utilizadas nas pastagens brasileiras, que geralmente, são de uso extensivo e sem grandes investimentos, mesmo assim possuem sucesso em seu estabelecimento e produção a curto prazo (DIAS-FILHO, 2014). Por conta disso, cerca de 50% dessas áreas estão presentes em algum nível de degradação. Portanto, recuperar essas áreas degradadas pelo uso extensivo de pastagens é de grande importância para um sistema produtivo sustentável, pautado na melhoria da produtividade e na conservação ambiental. Estudos indicam que, teoricamente, para cada 1 hectare recuperado, outros 3 podem ser utilizados para fins de reflorestamento e preservação sem perdas na produtividade no sistema pecuário (DIAS-FILHO, 2017).

Uma forma de contribuir com uma produção menos danosa ao ambiente é pelo aumento da produtividade das pastagens. De acordo com Valentim e Andrade (2009), em biomas como Cerrado e Amazônia, um aumento na produtividade da pastagem poderia evitar a derrubada de mais de 140 milhões de hectares. Portanto, a recuperação dessas áreas através de um uso do solo mais sustentável e eficiente pode ser uma alternativa para reduzir o desmatamento em regiões ameaçadas dos biomas brasileiros.

A Mata Atlântica é um dos principais *hotspots* mundiais de biodiversidade, abrigando cerca de 5% de toda a flora mundial e das espécies de vertebrados (MYERS et al., 2000). Porém, esse bioma brasileiro vem sofrendo grandes ataques a sua biodiversidade, por meio da degradação por meio de atividades extrativistas e agropecuárias, como por exemplo, o cultivo de pastagens (DEAN; SCHWARTZ, 1997; JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014). Além disso, estudos demonstram que essas alterações no uso do solo alteram o microbioma do solo, e suas propriedades físicas, químicas e por consequência afetamos serviços ecossistêmicos realizados no ambiente (MENDES et al., 2015; VELDKAMP, 1994).

Entre as plantas que foram avaliadas neste estudo quanto ao seu potencial em alterar a comunidade microbiana relacionada ao ciclo do P, está presente a *Urochloa ruziziensis*, uma cultivar tradicional que apresenta uma grande produção de biomassa, com uma qualidade nutricional elevada (RESENDE et al., 2016). Outra cultivar tradicional, amplamente utilizada nas pastagens brasileiras é a *Urochloa brizantha* cv. Marandu, uma cultivar resistente às cigarrinhas da pastagem, tolerante ao frio, a seca e ao fogo (NUNES et al., 1984). Neste estudo, foi avaliado também um híbrido dessas duas cultivares - BRS RB331 Ipyporã (*Urochloa ruziziensis* x *Urochloa brizantha*), planejado para prover uma alta produtividade, tem um grande valor nutritivo e propicia uma boa cobertura do solo, além de também ser resistente a cigarrinhas (VALLE et al., 2017). Outra variedade que foi abordada é a *Urochloa brizantha* BRS Paiaguás, que tem sido usada por promover uma diversificação de pastagens em solos de

cerrado, tem vantagem no período seco, por promover um acúmulo de forragem com alto valor nutritivo (EMBRAPA, 2013)

Pouco se sabe sobre a influência do melhoramento dessas espécies sobre a comunidade microbiana do solo e estudos comparativos sobre os mecanismos de absorção de P por essas plantas ainda são escassos. Porém, evidências indicam que o melhoramento de plantas tradicionais pode afetar também, a composição da comunidade microbiana associada a planta hospedeira, resultando em alterações nas funções exercidas por essa microbiota e na forma em como os microrganismos interagem (LEITE et al., 2021; MENDES et al., 2018; MOMESSO et al., 2022; ROSSMANN et al., 2020; ZHOU et al., 2019). Além disso, como espécies de FMA apresentam certa preferência por determinados hospedeiros, a hibridização e o melhoramento genético podem influenciar na relação planta-hospedeiro (POUYU-ROJAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2006).

Para isso, por meio de técnicas como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), que torna possível acessar a abundância quantitativa de genes funcionais e de marcadores filogenéticos, foram investigados os genes funcionais associados a produção de ácido glucônico (*pqqC*) e a produção de fosfatases (*phoD*). Foram estudados também, a composição da comunidade de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* pelo sequenciamento de marcadores filogenéticos. Para bactérias e arqueias, foi utilizado o gene 16S rRNA, que é utilizado como marcador filogenético para estudos dessas comunidades (CAPORASO et al., 2011; TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008). Já para fungos utilizou-se a região ITS, que vem sendo utilizada como marcador universal, sendo superior que outras regiões para esse tipo de estudo (MANTER; VIVANCO, 2007; SCHOCH et al., 2012).

Assim, em um cenário de intensificação de mudanças climáticas e da constante busca por métodos de produção sustentáveis, a restauração de pastagens por meio de práticas de manejo sustentáveis deve ser encorajada, e novos métodos que sejam rentáveis ao produtor devem ser estudados. Portanto, o presente estudo buscou avaliar o potencial de variedades de *Urochloa* na restauração de pastagens degradadas como forma de manejo, avaliando como o melhoramento de variedades de *Urochloa* influencia a estruturação e abundância da microbiota associada ao ciclo do P, em diferentes profundidades do solo.

2. HIPÓTESE

As alterações provocadas pelo melhoramento genético em variedades de *Urochloa*, além de aumentar a qualidade nutritiva e a tolerância a estresses ambientais, alteram o microbioma do solo e a relação planta-microbiota, alterando a disponibilidade de P para plantas durante o período de baixa precipitação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar como o melhoramento genético de *Urochloa* (através de hibridização entre *U. brizantha* e *U. ruzizienensis*) altera as comunidades de Archaea, Bacteria e Fungi, e se essas alterações refletem na ciclagem do P pela microbiota, medidas através de enzimas e genes associados à mineralização do fósforo na rizosfera, em diferentes profundidades do solo. O interessante da escolha dessas cultivares é foi possível realizar comparações entre um híbrido e duas cultivares que foram utilizadas para a hibridização, além de outra cultivar de *Urochloa brizantha* (BRS Paiaguás), melhorado para condições de cerrado.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a estrutura, composição, abundância e potencial funcional das comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi* associadas às diferentes variedades de *Urochloa* estudadas.
2. Verificar como a ciclagem do P através das medidas das frações de fósforo no solo é modificada pelas variedades de *Urochloa*, através de análises das enzimas caracterizadas como bioindicadores de P (fosfatase ácida e fosfatase alcalina) no solo e das frações do P presente, no período seco.
3. Integrar os dados por meio de métodos estatísticos, bioinformática e redes de correlação para evidenciar a alteração do microbioma pelo melhoramento genético de variedades de *Urochloa*.

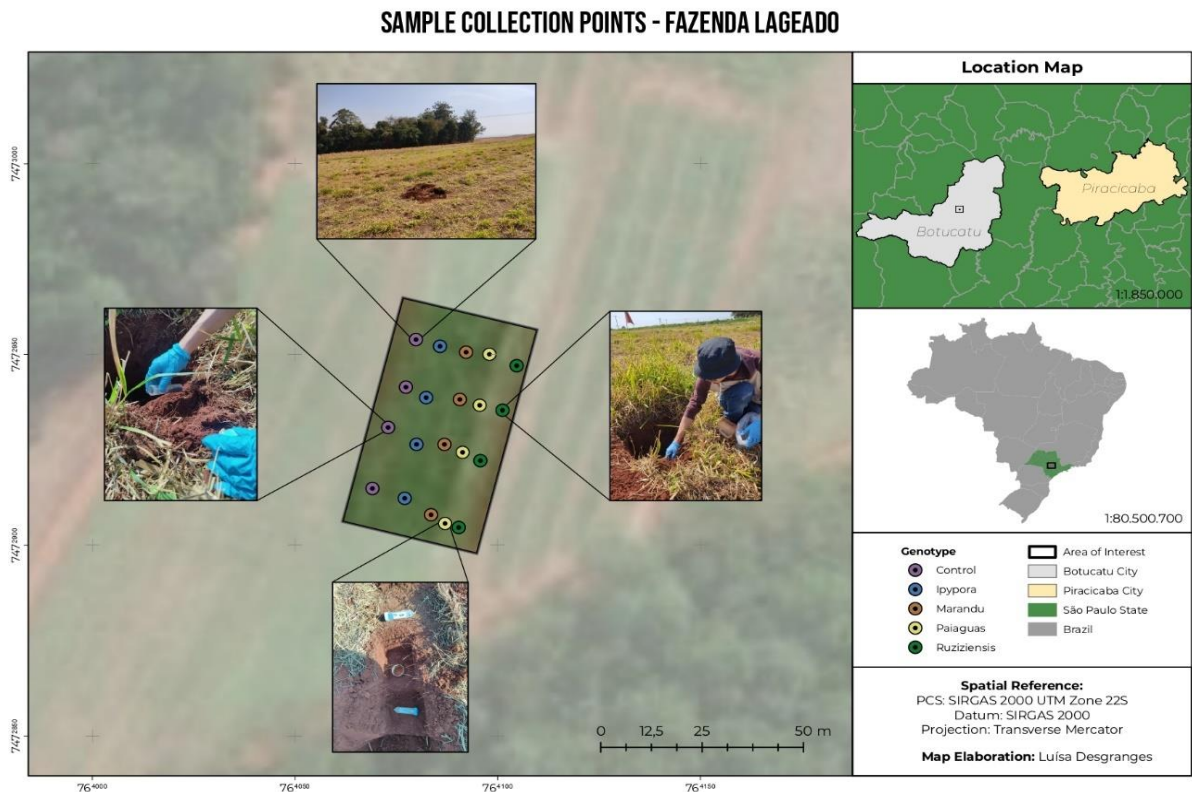
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de estudo

O experimento de campo foi realizado na Estação de Fazenda Experimental da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil (22° 83' 3" S, 48° 42' 64" W, altitude de 765 m). O campo havia sido utilizado para agricultura nos últimos dez anos, e o histórico de uso da terra está detalhado na Tabela Suplementar 1, e as características de textura do solo antes da instalação do experimento está disponível na Tabela Suplementar 2. O clima é do tipo Cwa, de acordo com a classificação de Köppen. A média anual de temperatura de longo prazo (1956-2019) é de 20,7°C (máxima de 26,1°C e mínima de 15,3°C), com uma média anual de precipitação de 1360 mm.

O experimento foi iniciado em abril de 2019. A cultura anterior cultivada na área foi a soja com manejo de plantio direto. Após a colheita da soja, o solo foi preparado adicionando-se P e potássio (K) na linha de semeadura com base na análise de fertilidade do solo e seguindo as recomendações de adubação para o estado de São Paulo (RAIJ et al., 2001). A densidade de semeadura foi de 4 kg por hectare. Foram semeadas quatro variedades de *Urochloa*: *Urochloa brizantha* cv. Marandu (tratamento UM) e *Urochloa ruziziensis* (UR), consideradas as variedades mais amplamente utilizadas no Brasil; e *Urochloa* spp. cv. Ipyporã - BRS RB331 (um híbrido de *Urochloa ruziziensis* x *Urochloa brizantha*) (UI) e *Urochloa brizantha* cv. BRS Paiaguás (UP), que são variedades recentes disponíveis no mercado de sementes brasileiro. As variedades estão classificadas de acordo com suas características na Tabela Suplementar 3. Além das variedades, foi adicionado um tratamento controle representando o solo sem a presença da planta. Foram realizadas um total de 20 parcelas ((4 variedades + 1 controle) x 4 repetições x 3 profundidades). Cada parcela tinha 15 m x 20 m e um espaço de 2 m entre cada parcela (Figura 1). Dois anos após a semeadura, foram realizadas amostragens de solo e planta (abril de 2021).

Figura 1. Mapa de localização das parcelas localizadas no campo experimental da Fazenda Lageado (UNESP), Botucatu/SP. As fotos no mapa descrevem os procedimentos de coleta.



Fonte: Luísa da Costa Desgranges.

4.2 Amostragem do Solo

Amostras de solo foram coletadas em cinco pontos dentro de cada parcela (um ponto central e quatro pontos em cada canto) em três profundidades (10 centímetros de distância). As amostras foram então misturadas para formar uma amostra composta por ponto. Aproximadamente 600 gramas de solo foram coletadas para determinar as características químicas e texturais do solo. Amostras não perturbadas foram coletadas usando uma sonda e anéis metálicos (100 cm³). Após a coleta, as amostras foram enroladas e imobilizadas em filme plástico aderente, cuidadosamente armazenadas em caixas de papelão e transportadas para o laboratório para análise de densidade e porosidade. Além disso, 50 mg de solo foram coletados em tubos Falcon, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20°C para extração de DNA.

4.3 Amostragem de Plantas, Biomassa e Conteúdo de Nutrientes

Um total de 30 folhas aleatórias de *Urochloa* foram coletadas de cada parcela e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior quantificação de nutrientes, seguindo a metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Além disso, as raízes de *Urochloa* foram coletadas de cada parcela usando uma sonda e anéis metálicos (100 cm³). A parte aérea das plantas também foi coletada em uma área de 1 x 1 metro dentro de cada parcela para determinar a biomassa das plantas. As partes aéreas das plantas foram secas em estufa com ventilação forçada a 60°C por 72 horas. As raízes foram armazenadas em FAA 70% para análises posteriores.

4.4 Análise Química e Física do Solo

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Agronômicas Agrilab, com base em solo homogeneizado usando uma peneira de 2 mm, seco ao ar e pesado de acordo com a necessidade de cada análise (método gravimétrico). Resumidamente, o pH e a matéria orgânica do solo (MOS) foram medidos usando CaCl₂ 0,01M e método Walkley-Black, respectivamente. Os valores foram então convertidos para carbono orgânico do solo (COS) multiplicando o valor de MOS por 0,58. Fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram extraídos usando resina e determinados pelo método colorimétrico. Enxofre (S) foi extraído usando sulfato de enxofre e quantificado pelo método turbidimétrico. Manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e ferro (Fe) foram extraídos usando DTPA e determinados por espectrometria de absorção atômica. Alumínio (Al) foi extraído usando KCl e medido por titulação. A acidez potencial (H⁺Al) foi determinada pelo método de Shoemaker-McLean-Pratt. Com base nos resultados, a soma de bases (SB) foi calculada somando os cátions K, Ca e Mg.

4.5 Análise Enzimática

A avaliação da atividade da fosfatase, um indicador bioquímico das transformações de fósforo no solo, foi realizada usando um método colorimétrico (EIVAZI; TABATABAI, 1977). As amostras de solo foram homogeneizadas, passadas por uma peneira de malha 4 mm e armazenadas a 4°C antes da análise. O substrato utilizado para a fosfatase foi fosfato de sódio p-nitrofenil com um tampão universal modificado (MUB) a pH 5,5 para fosfatase ácida e pH 11,0 para fosfatase alcalina. A solução foi agitada e filtrada através de papel de filtro C42 (faixa azul) antes de ser lida em 400 nm. A quantidade de p-nitrofenol foi determinada por correlação com uma curva padrão construída com quantidades conhecidas de p-nitrofenol.

4.6 Fracionamento do Fósforo

O fracionamento do fósforo foi realizado no laboratório do Grupo de Estudos em Fertilidade do Solo e Adubação (GEFA), coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Sérgio Pavinato do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP, utilizando a metodologia simplificada de extração sequencial proposta por (GATIBONI; CONDRON, 2021). A análise foi focada nas frações lábil (Mehlich-3), moderadamente lábeis (Pi e Po), não lábil (P ocluso) e fósforo total.

4.7 Colonização de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA)

A colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi analisada por meio da coloração das raízes, seguindo o protocolo estabelecido por (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980), que envolveu a descoloração das células para obter raízes transparentes e a coloração das hifas de FMA com azul de metileno 0,05%. A análise foi realizada sob um microscópio estereoscópico usando o método de contagem de fragmentos em lâminas, fotos de estruturas micorrízicas estão presentes no material suplementar (Imagem Suplementar 01).

4.8 Extração de DNA do solo

A extração de DNA do solo foi realizada usando o Kit de Isolamento de DNA Power Soil (Qiagen, Hilden, Alemanha) em 0,25 g de amostras de solo de acordo com as instruções do fabricante. A amostra de solo foi homogeneizada e as células microbianas foram lisadas por métodos mecânicos e químicos. O DNA genômico total resultante foi capturado em uma membrana de sílica em formato de coluna de centrifugação, lavado e eluído para obter o extrato. A concentração de DNA foi medida usando um fluorímetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e a qualidade do DNA foi verificada por meio da análise de eletroforese em gel de agarose de ácido bórico a 1% (BRODY; KERN, 2004).

4.9 Sequenciamento metagenômico

Todas as amostras de DNA foram submetidas ao sequenciamento metagenômico *shotgun* na NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, Brasil), utilizando a plataforma Illumina NovaSeq 6000 (2x150pb) (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). As sequências pareadas geradas pelo sequenciamento metagenômico *shotgun* foram inicialmente montadas usando a ferramenta PEAR (ZHANG et al., 2014), incorporando sequências *forward* e *reverse*, bem como quaisquer *reads forward* não mescladas. Sequências com qualidade inferior a Q30 foram posteriormente removidas.

4.10 PCR em tempo real (qPCR) de marcadores genéticos

A quantificação das comunidades microbianas do solo foi realizada usando o ensaio de PCR em tempo real (qPCR), utilizando o sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e placas de 96 poços. O qPCR direcionou o gene 16S rRNA para a quantificação das comunidades bacterianas e arqueais, e o gene ITS para a quantificação das comunidades fúngicas. Além disso, a quantificação de microrganismos relacionados ao ciclo do fósforo foi realizada, incluindo bactérias solubilizadoras de fósforo (com base no gene *pqqC*) e mineralização de fósforo por meio da produção de fosfatase alcalina (com base no gene *phoD*), a sequência dos primers e referências é fornecida na Tabela Suplementar 4.

O cálculo do número de cópias foi realizado com base em uma curva padrão diluída entre 10^{10} e 10^1 cópias do gene alvo, previamente obtida por técnica de PCR a partir de uma amostra ambiental e submetida à amplificação de PCR convencional nas mesmas condições de temperatura e ciclagem de seus respectivos ensaios de qPCR (Tabela 1), exceto pelo mix de reagentes, onde foram utilizados 2,5 μ L de tampão 10x, 2 μ L de MgCl₂ 50 mM, 0,25 μ L de dNTPs 10 mM e 0,25 μ L de BSA 1% (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1 μ L de cada primer, 0,2 μ L de Platinum Taq (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 1 μ L de DNA, com adição de água ultrapura até atingir um volume final de reação de 20 μ L. Posteriormente, as amostras amplificadas foram purificadas usando o Kit de Purificação de DNA e Gel PCR GFX™ (GE Healthcare, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para confirmar a presença do gene alvo, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% usando um marcador de 1 kb. Com base no marcador e nos tamanhos esperados dos *amplicons*, a banda correspondente ao tamanho do gene alvo foi considerada positiva. A técnica de qPCR foi realizada em triplicata para cada amostra usando o instrumento StepOne Plus (Applied Biosystems) com um volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de cada primer (5 pmols) (Tabela 9), 1 μ L de DNA (10 ng/ μ L) e 2 μ L de água ultrapura estéril.

4.11 Análise estatística

A análise estatística do estudo foi conduzida para avaliar o impacto de diferentes variedades de *Urochloa* nas comunidades microbianas do solo. Um total de 60 amostras foram analisadas, incluindo 4 variedades de *Urochloa* e um grupo controle, com 4 réplicas biológicas e 3 profundidades. Os dados foram analisados utilizando o ambiente R (versão 2022.12.0+353; R CORE TEAM, 2020) utilizando diversos pacotes estatísticos, incluindo "ggplot2" (versão

3.4.0; WICKHAM, 2016) para criação de gráficos, "vegan" (versão 2.6-4; OKSANEN et al., 2015) e "agricolae" (versão 1.3-5; MENDIBURU; SIMON, 2015) para análise estatística.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade (usando o teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (usando o teste de Levene) antes da análise estatística. As comparações entre solos de diferentes áreas e profundidades foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas, seguido pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). A significância de cada característica do solo foi avaliada usando o teste PERMANOVA (baseado em 999 permutações). A significância dos agrupamentos obtidos foi determinada usando o teste permutacional ADONIS, seguido pelo teste de Adonis em pares (ambos baseados em 999 permutações e ajustados pela correção de Bonferroni). A abundância de genes obtida por meio de qPCR foi representada como Box-Plots e a atividade enzimática do solo como gráficos de barras.

4.12 Análise bioinformática

As sequências de DNA pareadas foram então anotadas usando o algoritmo Kraken2 (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019) e classificadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A taxonomia das sequências foi determinada usando as bases de dados de genomas completos RefSeq (O'LEARY et al., 2016). As matrizes de dados geradas a partir desse processo foram posteriormente curadas para reter apenas sequências anotadas como bactérias, arqueias e fungos. Os genes funcionais foram anotados usando o banco de dados curado PCycDB (ZENG et al., 2022), específico para genes relacionados ao ciclo do fósforo.

Todas as análises estatísticas e bioinformáticas subsequentes foram conduzidas no ambiente R (versão 4.2) usando o software RStudio (versão 2022.2.3.492). Todas as análises relacionadas às comunidades microbianas nas amostras de solo foram realizadas usando o pacote microeco (LIU et al., 2021).

Para a diversidade alfa, uma medida de diversidade dentro de uma amostra, os dados foram rarefeitos para o tamanho mínimo da biblioteca, e a diversidade observada foi calculada. As diferenças entre as variedades e profundidades foram avaliadas usando o teste de Kruskal-Wallis, com correções usando a taxa de descoberta falsa de Benjamini-Hochberg. A diversidade beta foi usada para avaliar as diferenças no microbioma entre as amostras. Os dados foram ordenados usando a distância euclidiana, e um NMDS foi plotado em dois eixos. As diferenças estatísticas entre os índices de diversidade beta foram determinadas usando a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA).

Os principais fatores ambientais que influenciam as diferenças entre as comunidades foram identificados usando análise de redundância baseada em distância (dbRDA) com base em matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis. A seleção progressiva (FS) e testes de permutação de Monte Carlo foram aplicados com 1000 permutações aleatórias para avaliar a significância das propriedades físicas, químicas e bioquímicas do solo nas comunidades microbianas.

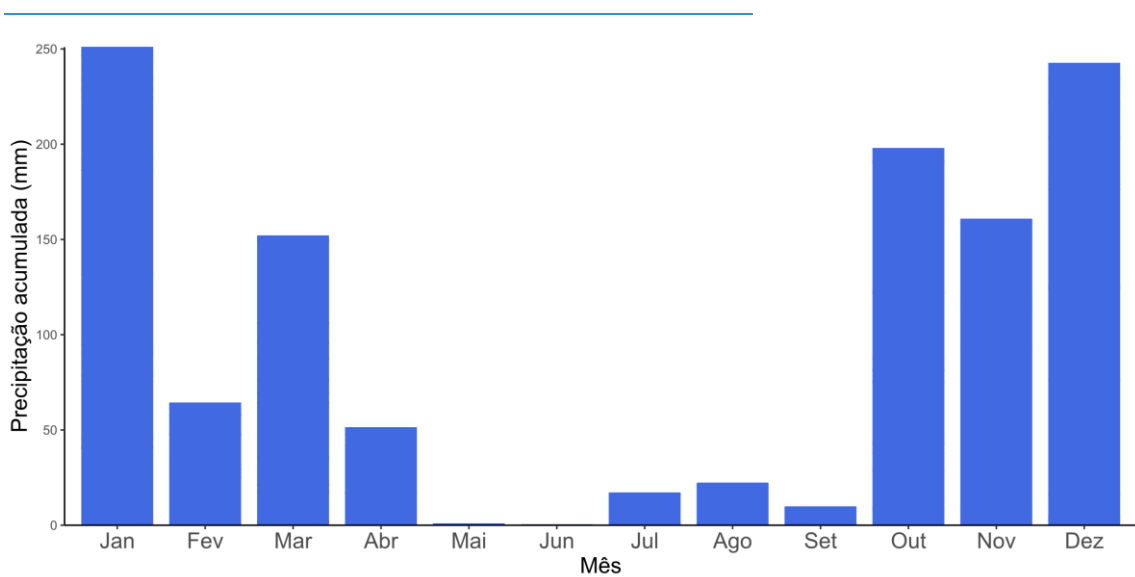
Análises de rede foram usadas para avaliar padrões de correlação com base na taxonomia. Para esse propósito, análises de coocorrência não aleatória foram realizadas usando o método SparCC (FRIEDMAN; ALM, 2012). Para cada tratamento, redes foram construídas, considerando apenas correlações fortes ($\text{SparCC} > 0,8$ ou $< -0,8$) e correlações altamente significativas ($p < 0,001$). Os gráficos de rede foram baseados em várias medidas, como número de nós, arestas, modularidade, número de comunidades, conectividade média dos nós, comprimento médio do caminho, diâmetro e distribuição cumulativa de graus. A visualização e as propriedades da rede foram calculadas usando a plataforma interativa Gephi (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009). Módulos, centros de módulos, centros de redes e a interseção das arestas da rede foram calculados usando a ferramenta meconetcomp do pacote microeco no RStudio.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização biogeoquímica do solo

As amostras de solo foram coletadas durante um período de baixa precipitação, com uma média de menos de 2 mm no mês de agosto (Figura 2a). A textura do solo foi caracterizada como argiloso arenoso de acordo com o triângulo textural montado com base no sistema de classificação do SiBCS. Houve diferença significativa na fração lábil do P entre as variedades na profundidade de 0-10cm, onde UR apresentou os maiores valores, seguido de UI e UP (Tabela 1). Além disso, em relação a massa seca e conteúdo nutricional das folhas, observa-se que UP apresentou os maiores valores para massa seca e também apresentou os maiores valores de nutrientes nas folhas para a maior parte dos nutrientes foliares avaliados (Tabela Suplementar 5).

Figura 2. Precipitação média acumulada por mês no ano de 2021.



Precipitação média acumulada por mês no ano de 2021 com base nos dados fornecidos pela estação de monitoramento na área experimental. Fonte: Autoria própria.

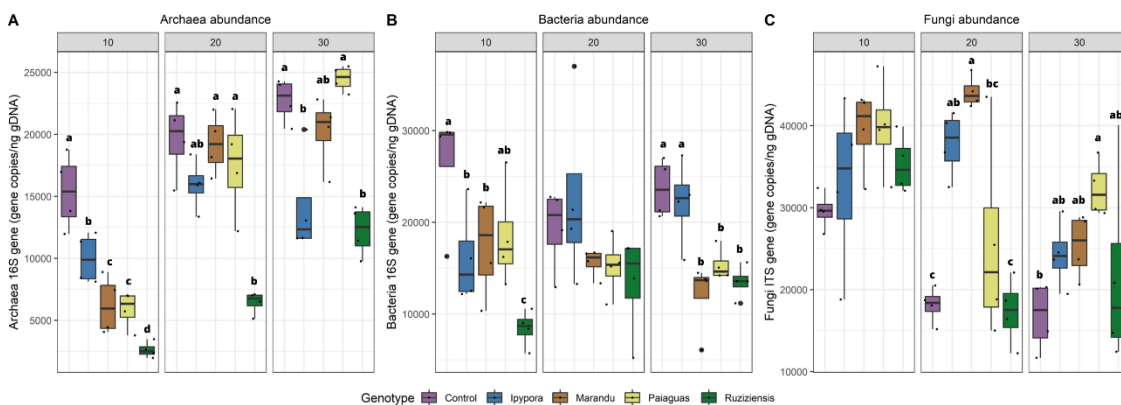
Tabela 1. Quantidade de P lábil (resina) presente nas amostras de solo.

Soil characteristics	Treatments					p-Value
	Control	UI	UM	UP	UR	
P (mg/Kg)						
0-10cm	16.03±3.68b	34.10±12.89ab	16.54±3.64b	27.75±8.73ab	39.10±15.11a	0.01
10-20cm	11.10±6.24	15.95±9.93	18.18±9.97	13.30±5.81	13.00±4.82	ns
20-30cm	5.05±3.12	4.95±2.56	3.95±1.68	3.15±0.97	7.00±2.66	ns

Fonte: Autoria própria

A quantificação da comunidade microbiana foi medida por meio de PCR quantitativo (qPCR) de genes marcadores procarióticos (16S) e fúngicos (ITS). Observamos que a presença de plantas tendeu a diminuir a quantidade de bactérias e arqueias quando comparadas ao controle, especialmente na variedade UR (Figura 3a e b). No entanto, a abundância de fungos tende a diminuir no controle, havendo diferença significativa entre UI e UM do controle e de UR (Figura 3d).

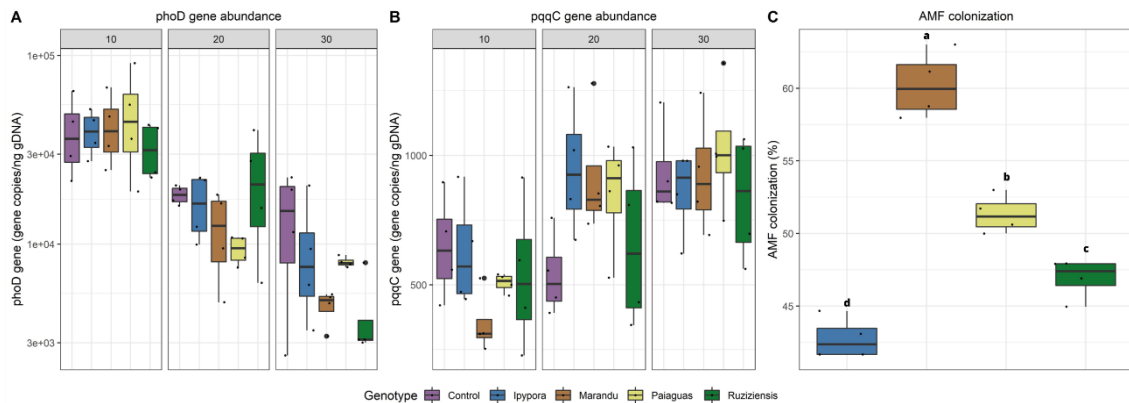
Figura 3. Abundância das comunidades microbianas avaliadas nas variedades nas três profundidades amostradas.



Abundância das comunidades de A) Archaea; B) Bactéria e C) Fungi, avaliadas nas variedades nas três profundidades amostradas (0-10cm, 10-20cm e 20-30cm). Diferenças estatísticas estão presentes na Tabela Suplementar 5. Fonte: Autoria própria.

A quantificação de genes relacionados à solubilização (Figura 4a) e mineralização (Figura 4b) de fósforo também foi avaliada. Observamos que, independentemente do tratamento, os genes relacionados à mineralização de P orgânico tenderam a diminuir com a profundidade. Em contraste, a expressão do gene de solubilização de P inorgânico tendeu a aumentar com a profundidade, porém sem diferenças significativas entre as variedades. Além disso, observamos variações no nível de colonização radicular por FMAs entre as diferentes variedades (Figura 4c).

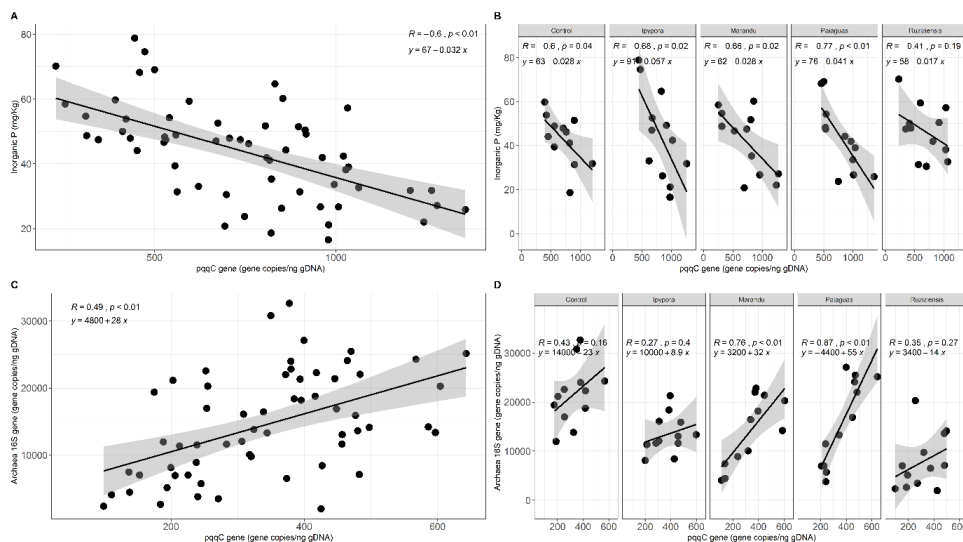
Figura 4. Abundância de genes relacionados a ciclagem do P, nas diferentes profundidades avaliadas e avaliação da colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares (FMA).



Abundância de genes relacionados a A) solubilização de P por bactérias (*pqqC*) e B) produção de fosfatase alcalina (*phoD*), nas diferentes profundidades avaliadas. C) Colonização radicular por FMA. Diferenças estatísticas estão presentes na Tabela Suplementar 5. Fonte: Autoria Própria.

Ao avaliar os genes e suas correlações com as frações de P obtidas por fracionamento de P, observamos que o gene *pqqC* apresenta uma forte correlação negativa com a fração de P inorgânico (Figura 5a e b). Observa-se uma correlação positiva entre a abundância do gene 16S de *Archaea* e o gene *pqqC* (Figura 5c e d) e que essa correlação é mais forte em UM comparada as demais variedades.

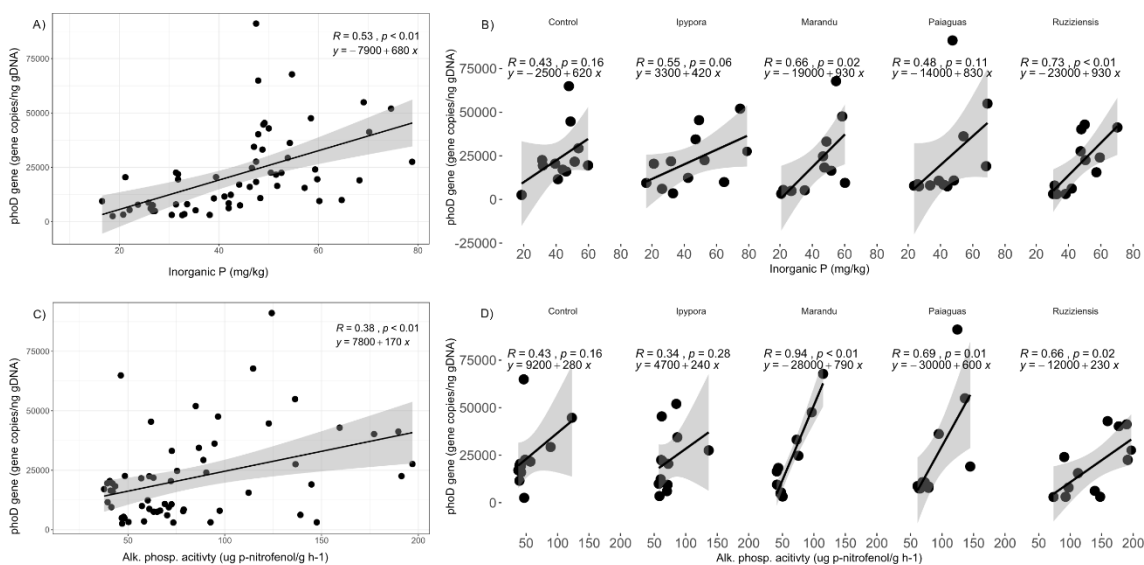
Figura 5. Gráficos de correlação entre variáveis, apresenta uma visão geral e uma visão por variedade.



Gráficos de correlação entre as variáveis A) gene *pqqC* e fósforo inorgânico do solo com visualização geral e B) por variedade; C) gene *pqqC* e gene 16S de arqueia com visualização geral e D) por variedade. Fonte: Autoria própria.

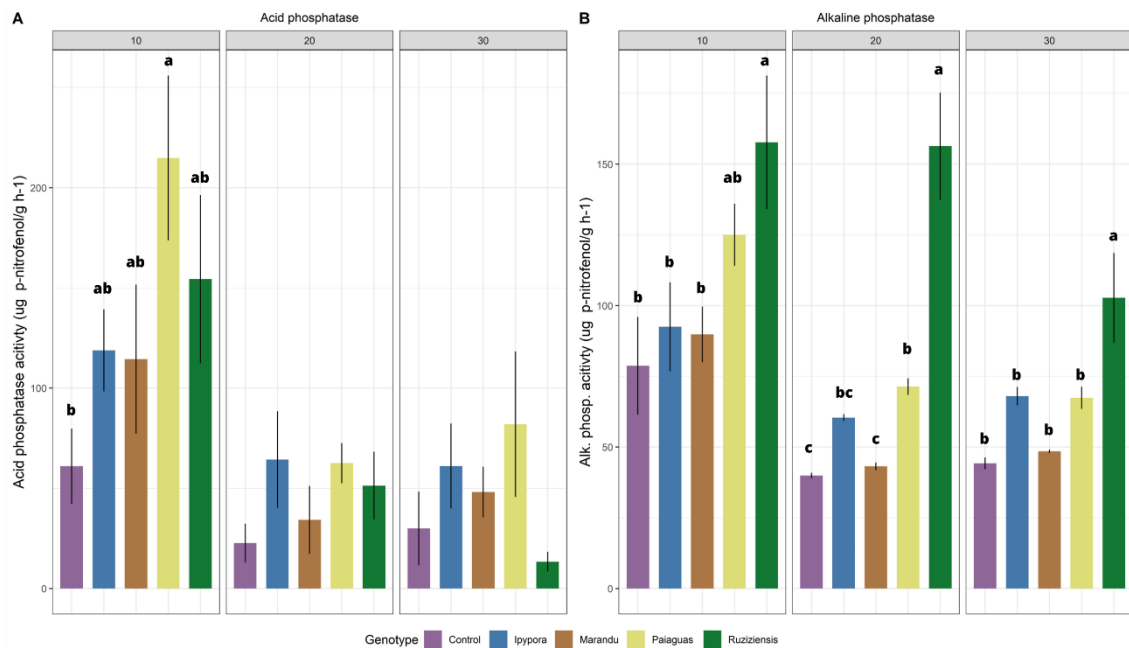
Baseado no gráfico de correlações (Figura 6), nota-se uma correlação significativa entre o gene *phoD* e a fração Pi (Figura 6a), porém, quando avaliada separadamente para cada variedade, é possível notar que a correlação só é significativa para UM e UR (Figura 6b). Observa-se também uma correlação positiva entre o gene *phoD* e a produção da fosfatase alcalina, porém essa correlação não é significativa para todas as variedades (Figura 6c e d). UM apresenta uma correlação significativa forte ($R^2 = 0,94$; $p < 0,01$) enquanto UI não apresenta correlação significativa ($p = 0,28$), UR e UP também apresentaram uma correlação significativa entre as variáveis, porém menos intensas que UM.

Figura 6. Gráficos de correlação entre variáveis, apresenta uma visão geral e uma visão por variedade.



Gráficos de correlação entre as variáveis A) gene *phoD* e fósforo inorgânico do solo com apresentação geral e B) por variedade; C) gene *phoD* e fósforo inorgânico do solo com apresentação geral e D) por variedade. Fonte: Autoria própria.

Para a análise da atividade enzimática, a enzima fosfatase ácida teve seu maior nível de atividade em UP e a menor atividade no controle, porém, a atividade cai com o aumento da profundidade, suavizando a diferença entre as variedades (Figura 7a). No entanto, para a fosfatase alcalina, observamos que, a uma profundidade de 0-10 cm, as variedades apresentaram variação, sendo o UR a variedade que apresentou maior atividade da enzima fosfatase alcalina (Figura 7b). Esse padrão foi mantido nas profundidades subsequentes, onde UR seguido de UP, apresentaram os maiores níveis da enzima em 10-20 cm e à 30cm de profundidade, apenas UR se diferencia do controle.

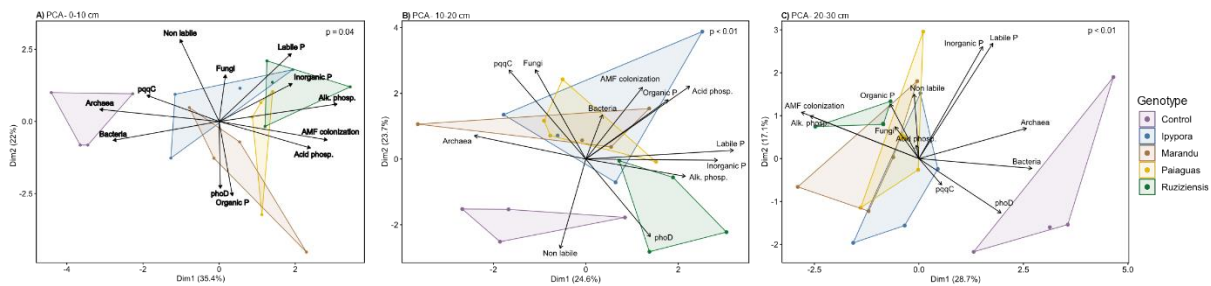
Figura 7. Atividade enzimática de fosfatases do solo.

Atividade enzimática das enzimas A) fosfatase ácida e B) fosfatase alcalina. Diferenças estatísticas estão presentes na Tabela Suplementar 5. Fonte: Autoria própria.

Para compreender a distribuição das variedades em relação às estratégias de absorção de P, considerando as variáveis bióticas e abióticas apresentadas, foram construídas Análises de Componentes Principais (PCA) para cada profundidade individualmente (Figura 8) para avaliar como a profundidade afeta a capacidade de modulação das variedades. Com base nessas análises, observou-se que nos primeiros 10 centímetros, há uma acentuada diferença entre UM e UR, o primeiro sendo mais influenciado pelo gene *phoD* e pela fração P_o , enquanto o segundo apresentou maior influência da enzima fosfatase alcalina e das frações inorgânica e lábil do P. Por outro lado, o UI agrupou-se a seus parentais (UR e UM), assim como UP (Figura 8a). A distribuição do controle foi influenciada pelo gene 16S de Archaea e Bacteria, além do gene *pqqC*.

Ao analisar a distribuição das variedades a uma profundidade de 10-20 cm, observou-se que as variedades de *U. brizantha* se agrupam no centro do gráfico, enquanto UR se afasta das demais, sendo mais influenciada pela produção de fosfatase alcalina e pelo gene *phoD* (Figura 8b). A 20-30 cm, observa-se que as variedades de *Urochloa* se agrupam, porém, permanecem separadas do controle. Porém, a *U. ruzizensis* se destaca pela significativa manutenção da atividade da fosfatase alcalina nas maiores profundidades (até 30 cm) em relação às demais variedades.

Figura 8. Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando variáveis bióticas e abióticas relacionadas à absorção e ciclagem de fósforo para explicar o modelo.

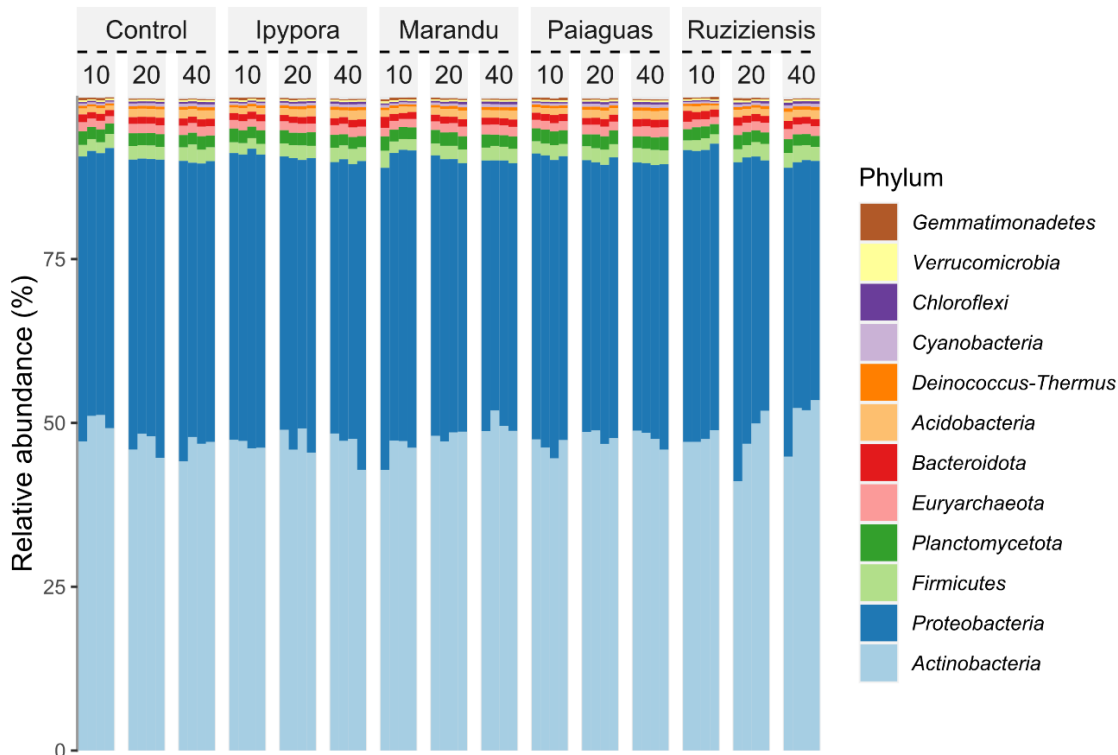


A) representa a profundidade de 0-10cm; B) a profundidade de 10-20cm e C) a profundidade de 20-30cm. Fonte: Autoria própria.

5.2 Caracterização metagenômica da comunidade microbiana

A abundância relativa de todas as amostras, independentemente da profundidade ou variedade, foi similar, sendo dominada por *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, seguidas por *Firmicutes*, *Planctomycetota* e *Euryarchaeota* (Figura 9).

Figura 9. Composição das comunidades microbianas procarióticas em nível de filo nas amostras de solo.

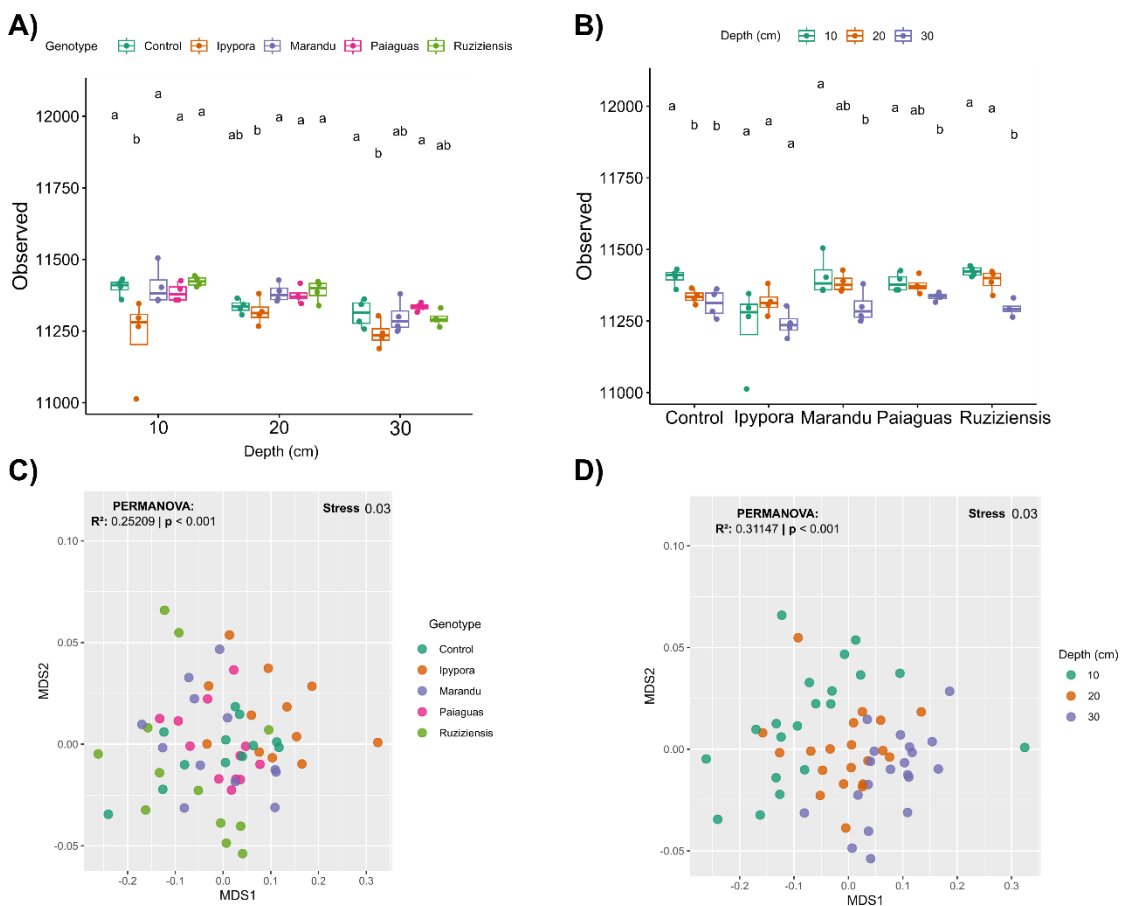


Para esta análise, foram consideradas 60 amostras, sendo 4 réplicas por tratamento, em 3 profundidades (0-10cm, 10-20cm, 20-30cm).

Fonte: Autoria própria.

Além disso, a variedade UI apresentou os menores valores de diversidade alfa em comparação com as outras variedades a uma profundidade de 0-10 cm. Embora essa tendência persista em outras profundidades, ela se torna menos evidente à medida que a profundidade aumenta (Figura 10a). Exceto pela variedade UI, as outras variedades exibiram uma diminuição na diversidade alfa com o aumento da profundidade (Figura 10b). Em termos de diversidade beta, observa-se que a variedade UI difere das outras variedades, enquanto os outros tratamentos não formam grupos distintos (Figura 10c). Além disso, há uma clara influência da profundidade na diversidade beta, com cada profundidade agrupada em um cluster distinto (Figura 10d).

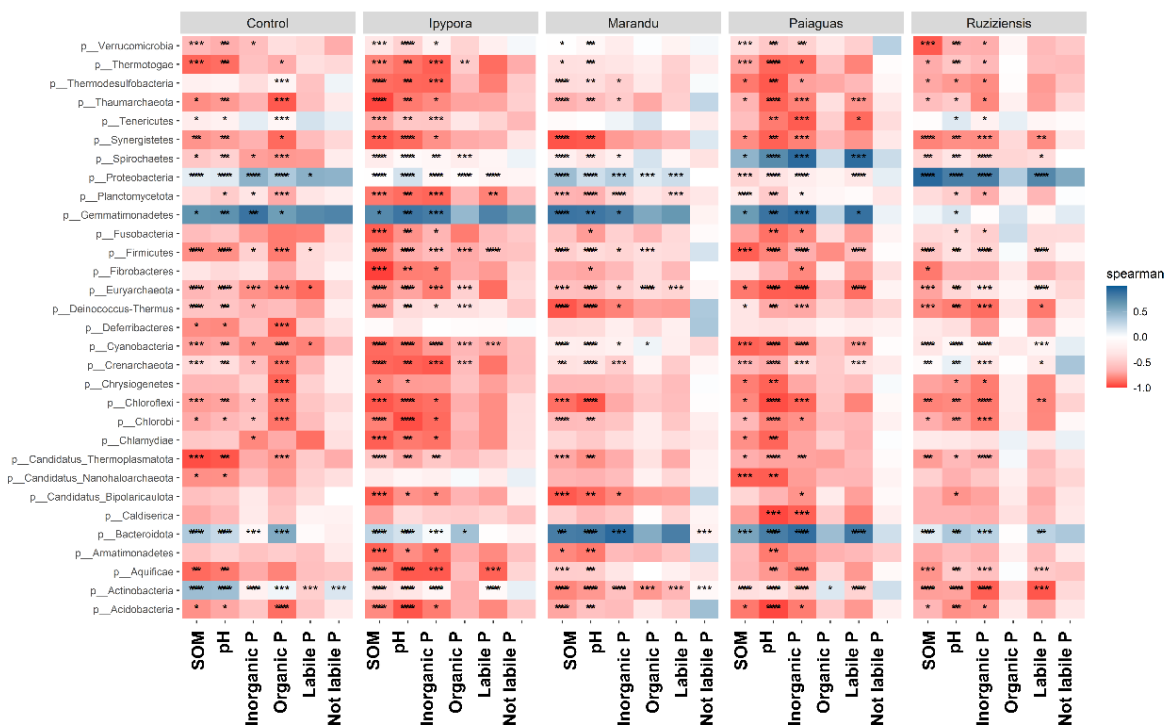
Figura 10. Alpha e beta diversidade das comunidades microbianas presentes nas amostras de solo.



A) Diversidade alfa de cada variedade e B) de cada profundidade de solo. Letras iguais não diferem significativamente (teste de comparações múltiplas com KW, correção: Benjamini-Hochberg - $p < 0,05$). C) Diversidade beta comparando as diferentes variedades e D) cada profundidade do solo (diferenças avaliadas por meio de análise PERMANOVA). Fonte: Autoria própria.

Com base em um *heatmap* que correlaciona os filos procarióticos presentes nas amostras de solo com as características do solo (Tabela Suplementar 5), observa-se um padrão distinto para as correlações entre os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, Bacteroidetes e Gemmatimonadetes (Figura 11). Esses filos apresentaram uma correlação positiva com as frações do solo (inorgânica, orgânica e lábil). Por outro lado, os demais filos apresentaram uma correlação negativa com as frações de fósforo. Além disso, o filo *Spirochaetes* demonstrou uma correlação positiva com as frações de fósforo do solo, especificamente na variedade UR. Em contraste, no controle, o filo *Actinobacteria* correlacionou positivamente com as frações de fósforo do solo.

Figura 11. *Heatmap* de correlação entre as variáveis do solo relacionadas ao ciclo do fósforo e os filos que se correlacionam com pelo menos uma das variáveis.

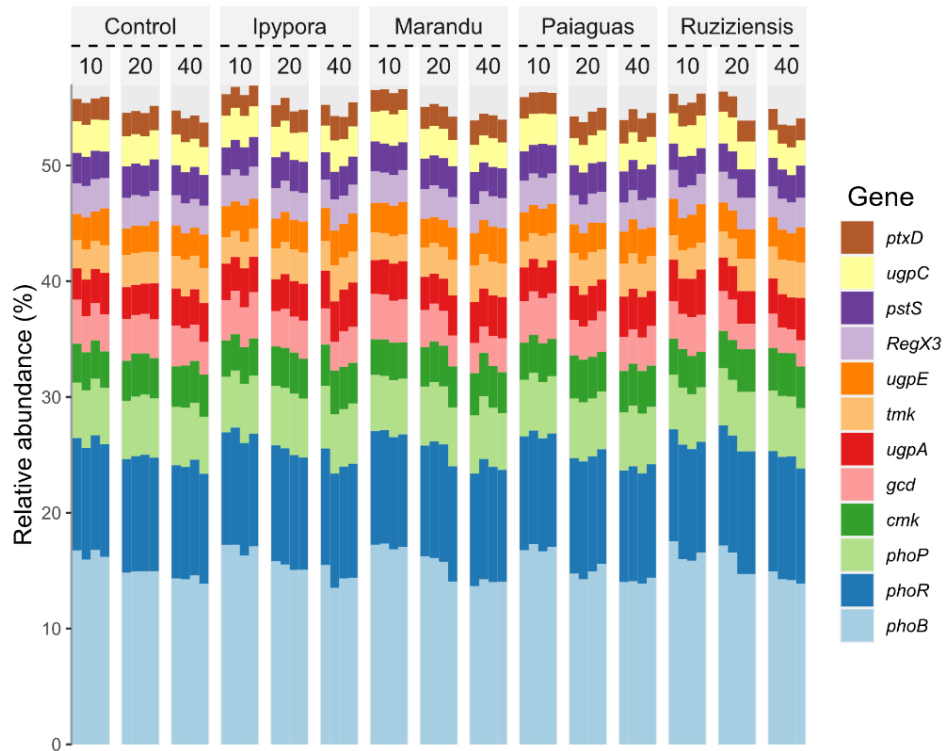


Para esta análise, foram consideradas 60 amostras, sendo 20 réplicas por tratamento, as amostras de profundidade foram utilizadas como réplicas.

Fonte: Autoria própria.

Em relação aos genes funcionais, há uma maior abundância do gene *phoB*, seguido pelos genes *phoR* e *phoP* (Figura 12). Além disso, há uma tendência de diminuição na abundância do gene *phoB* com a profundidade do solo, independentemente do tratamento.

Figura 12. Composição do perfil funcional potencial total no nível de filo nas amostras de solo.

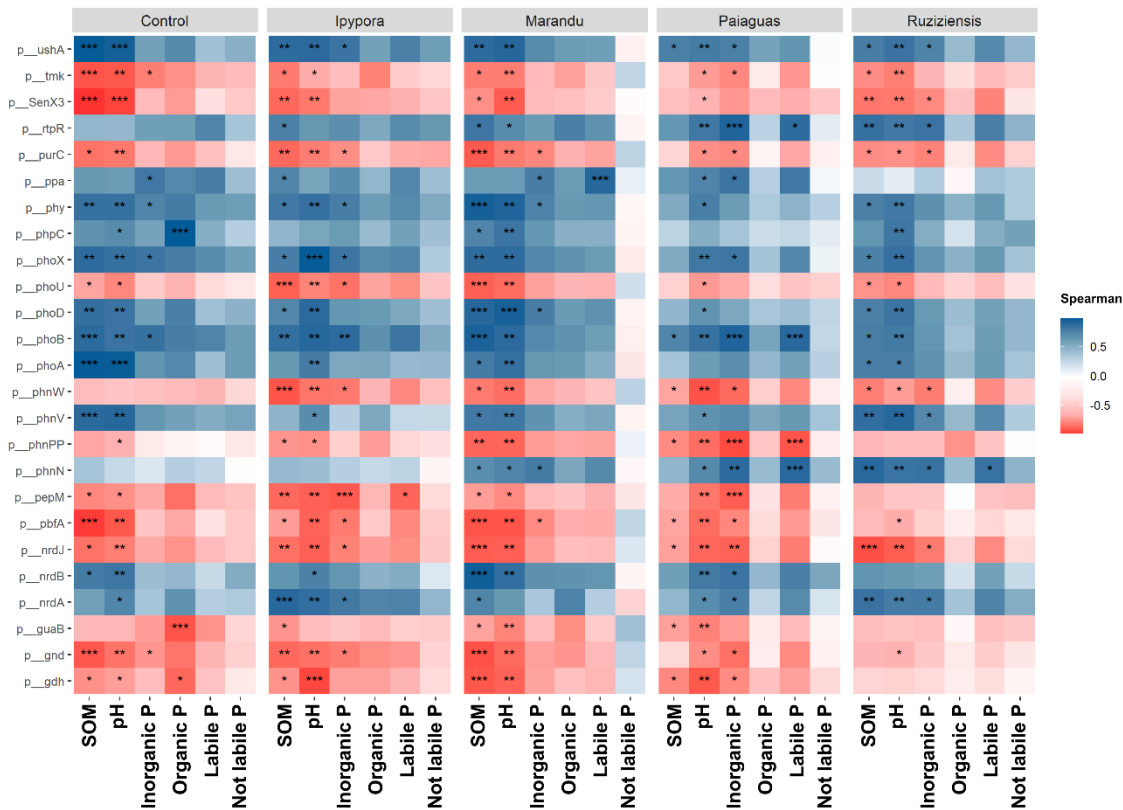


Para esta análise, foram consideradas 60 amostras, sendo 4 réplicas por tratamento, em 3 profundidades (0-10cm, 10-20cm, 20-30cm).

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise da correlação dos genes funcionais associados ao ciclo do fósforo e as frações de fósforo do solo, observou-se que na variedade UP, os genes *phoB*, *phnN* e *rtpR* exibiram uma correlação positiva com a fração de P lábil. Na variedade UR, o gene *phnN* também apresentou uma correlação positiva com a fração de P lábil. Em UM, a fração de P lábil correlacionou-se positivamente com o gene *ppa* (Figura 13).

Figura 13. Heatmap de correlação entre variáveis do solo relacionadas ao ciclo do fósforo e os genes funcionais potenciais que se correlacionam com pelo menos uma dessas variáveis.

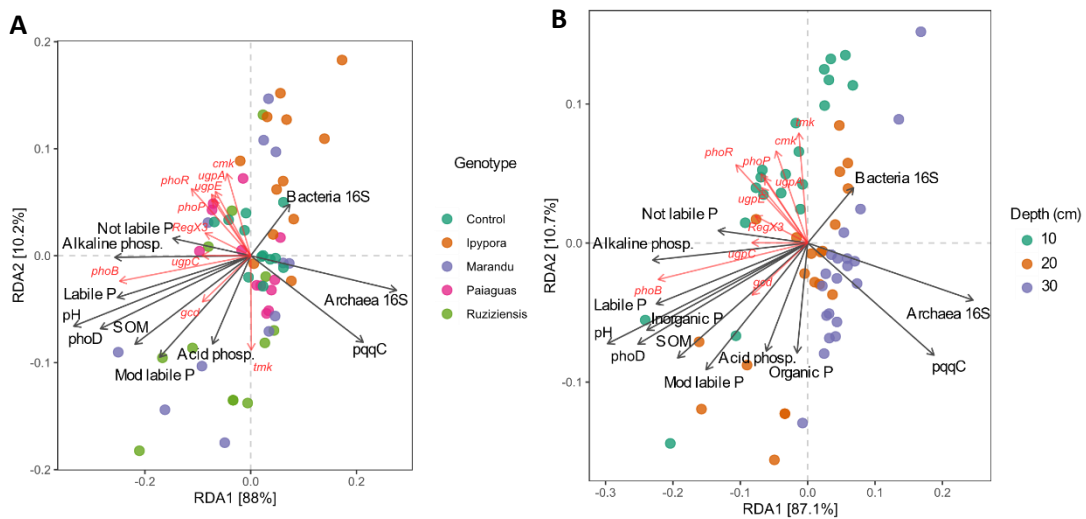


Para esta análise, foram consideradas 60 amostras, sendo 20 réplicas por tratamento, as amostras de profundidade foram utilizadas como réplicas.

Fonte: Autoria própria.

Uma análise de redundância baseada em distância (db-RDA) foi utilizada para demonstrar a estrutura da comunidade microbiana relacionada ao ciclo do fósforo e sua interação com as propriedades do solo. Uma análise inicial foi realizada independentemente da profundidade, onde todas as amostras foram agrupadas com base na distribuição das variedades, e os dois primeiros eixos do gráfico representaram mais de 88% da variação dos dados (Figura 14a). Pode-se observar que as variedades UR e UI se agrupam em lados opostos do gráfico. A variedade UR é mais influenciada pelos genes *gcd* e *phoB*, bem como por variáveis do solo associadas à produção de fosfatase. Por outro lado, a variedade UI exibe uma influência mais forte do gene *cmk* e da quantificação do gene 16S bacteriano quantificado por qPCR. As demais variedades se agrupam na região central do gráfico.

Figura 14. Análise de redundância baseada em distância (db-RDA) entre os perfis taxonômicos dos genes funcionais potenciais, e variáveis biogeoquímicas.

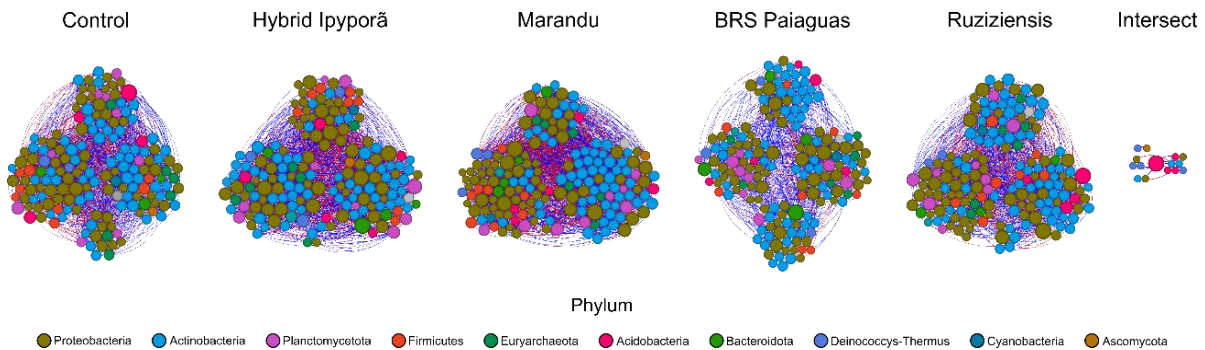


Legenda: Amostras de solo coloridas por A) variedade e B) profundidade. Fonte: Autoria própria.

Uma segunda análise foi realizada para examinar a relação entre a profundidade e as variáveis associadas ao ciclo do fósforo. Observa-se que cada profundidade forma grupos distintos, sendo a profundidade de 0-10 cm oposta à profundidade de 20-30 cm, e a profundidade de 10-20 cm ocupando uma posição intermediária entre as duas (Figura 14b). A profundidade de 0-10 cm está associada aos genes *cmk*, *phoR* e *phoP*, e essa relação enfraquece à medida que a profundidade aumenta. Por outro lado, há uma relação crescente entre as maiores profundidades e o gene *pqqC*, bem como a quantificação de *Archaea* por qPCR.

Utilizamos uma análise de rede de correlação (*networks*) para explorar a complexidade das interações dentro das comunidades microbianas associadas às variedades (Figura 15; Tabela 2). A variedade UM apresentou o maior número de nós (178), seguida por UP (175), UI (174), UR (171) e o tratamento controle (170). Esses números refletem a diversidade, sendo *U. brizantha* cv. Marandu a variedade com maior diversidade. Os números de arestas seguiram um padrão semelhante, com Marandu tendo o maior número (2.778), seguido por Hybrid Ipyporã (2.278), o controle (1.911), Ruziziensis (1692) e BRS Paiaguás (1.122). O grau médio foi maior em Marandu (31,21), seguido por Hybrid Ipyporã (26,18), o controle (22,48), Ruziziensis (19,79) e BRS Paiaguás (12,82), indicando interdependência. A modularidade foi maior em BRS Paiaguás (0,285), indicando uma rede bem estruturada. As arestas positivas foram mais prevalentes em BRS Paiaguás (81,19%), enquanto as arestas negativas foram mais frequentes em Marandu (41,79%).

Figura 15. Networks construídas a partir de análises de coocorrência não aleatória para as comunidades microbianas presentes nas amostras de solo.



As diferentes profundidades não foram consideradas para essas análises, e todas as amostras de cada variedade foram tratadas como réplicas. Uma aresta corresponde a uma correlação significativa ($\text{SparCC} > 0.8$ ou < -0.8) e é estatisticamente significativa ($p < 0.001$). Cada nó representa táxons no nível OTU, e o tamanho do nó é proporcional ao número de conexões (grau). As cores dos nós e arestas representam diferentes filos, as arestas estão coloridas em azul, para interações positivas e vermelha para as negativas. Fonte: Autoria própria.

Ao analisar as redes de correlação, foi possível determinar a interseção das redes, que representa as correlações que ocorrem da mesma maneira em todas as redes. Apesar de 98,2% dos nós serem compartilhados em todas as redes, apenas 0,1% das arestas estão presentes na interseção de todas as redes. Dentro da interseção, a interação entre *Pseudomonas* e *Azospirillum* foi observada como uma correlação significativa em todas as redes avaliadas. As demais interações não foram especificamente classificadas no nível de gênero, embora as interações entre Actinobacteria e Proteobacteria tenham sido consideradas de grande importância para a interseção das redes. Usando um teste de *Jaccard* para avaliar a similaridade das redes, observou-se que UP não se diferenciou das outras redes em termos de nós (Tabelas Suplementares 6 e 7). Por outro lado, ao considerar as arestas, todas as redes apresentaram distinções notáveis entre si.

Tabela 2. Características topológicas das redes calculadas a partir das análises de correlação.

	Controle	UI	UM	UP	UR
Nós ^a	170	174	178	175	171
Arestas ^b	1.911	2.278	2.778	1.122	1.692
Grau médio ^c	22,48	26,18	31,21	12,82	19,79
Modularidade ^d	0,196	0,180	0,155	0,285	0,202
Tamanho médio das arestas ^e	1.696	1.608	1.574	1.989	1.732
Arestas positivas ^f	63,47%	67,03%	58,21%	81,19%	65,9%
Arestas negativas ^g	36,53%	33,97%	41,79%	18,81%	34,1%
Diâmetro da <i>network</i> ^h	4	3	3	4	3

Para as análises de rede, diferentes profundidades não foram consideradas, e todas as amostras foram tratadas como réplicas.

^aTaxa microbianas (nível OTU) com pelo menos uma correlação significativa ($p < 0,001$) e forte (SparCC $> 0,8$ ou $< -0,8$);

^bNúmero de conexões (correlações) obtidas a partir da análise de correlação (SparCC);

^cNúmero médio de conexões por nó (OTU) na rede;

^dCapacidade dos nós de formar comunidades altamente conectadas, indicando uma estrutura com alta densidade de conexões entre os nós;

^eDistância média entre todos os nós na rede;

^fCorrelação positiva (SparCC: $> 0,8$ e $p < 0,001$);

^gCorrelação negativa (SparCC: $< -0,8$ e $p < 0,001$);

^hNúmero de módulos na rede.

Fonte: A autoria própria.

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização biogeoquímica do solo

Observa-se que o solo da área não apresentou grandes diferenças texturais, sendo um ambiente bem semelhante entre as parcelas, eliminando a influência da textura do solo na comunidade microbiana. Em relação a precipitação, foi observado um valor baixo comparado a média anual, indicando que a coleta foi realizada em uma época de baixa precipitação, o que pode influenciar o desempenho das variedades avaliadas. A partir da quantificação dos genes marcadores por qPCR, foi possível observar que não há diferenças significativas ou padrões claros em relação as quantificações de bactérias, arqueias e fungos. Porém, existe uma tendência de diminuição do gene *phoD* com um aumento da profundidade independentemente da variedade. Esse gene é responsável pela mineralização da fração Po, portanto, necessita de P advindo de fontes orgânicas, como a MO do solo e o próprio P imobilizado por microrganismos. No ambiente do solo, sabe-se que a maior concentração de MO e atividade biológica, ocorre nas camadas mais superficiais, que recebem uma entrada contínua de material orgânico (WEIL; BRADY, 2016), portanto, espera-se uma maior necessidade de mineralização de P em menores profundidades.

Os diferentes níveis de colonização radicular por FMAs pode indicar que a variedade UM apresenta uma preferência por formar relações simbióticas como estratégia de absorção de P, apresentando maior afinidade com FMAs. É evidente que a variedade UI apresenta os menores valores de colonização radicular por FMA dentre as variedades avaliadas, que pode ser resultado de alterações fenotípicas na estrutura radicular, que podem ser causadas pelo melhoramento genético e levam a uma perda da compatibilidade da relação simbiótica (ROSSMANN et al., 2020).

O gene *pqqC* codifica a enzima pirroloquinolina quinona (PQQ), que atua como cofator redox envolvido na oxidação de vários substratos, além de regular a expressão gênica e ser um gene marcador para bactérias mobilizadoras de fosfato (BMF) (MEYER et al., 2011). As BMF contribuem para aumentar a disponibilidade de fósforo no solo ao mineralizar o fósforo orgânico do solo em fósforo inorgânico acessível às plantas e solubilizar o fósforo inorgânico por meio da produção e excreção de ácido glucônico (NASSAL et al., 2018). Portanto, a correlação negativa do gene com a fração Pi indica a solubilização do mesmo. É interessante observar que a intensidade e significância da correlação é diferente entre as variedades (Figura 6b), onde UR não apresenta correlação significativa entre as variáveis, indicando que a transformação de Pi pode estar sendo mediada por outra via.

O gene *pqqC* foi caracterizado inicialmente como marcador para BMFs, porém, observa-se uma correlação positiva entre o gene 16S de Archaea e o gene *pqqC*. Essa correlação é particularmente interessante, pois a forma como as arqueias atuam na ciclagem do P ainda não é bem descrita na literatura. Uma explicação potencial para essa correlação é que o aumento da abundância de arqueias resulta em um aumento na quantidade de bactérias solubilizadoras de P, explicando assim a forte correlação positiva entre os dois genes. Além disso, é possível que as próprias arqueias desempenhem um papel na solubilização de P. Embora isso ainda não tenha sido demonstrado em pesquisas *in situ*, através da mineração de genoma (*in silico*), Siles e colaboradores (2022) encontraram evidências de que as arqueias podem conter o gene *pqqC* em seu genoma, indicando que elas podem ter a capacidade de realizar a solubilização de P por si mesmas.

A correlação entre o gene *phoD* e a produção da fosfatase alcalina, está de acordo com o entendimento estabelecido de que o gene *phoD* é um gene marcador associado a esse tipo de enzima (SAKURAI et al., 2008). Outro dado interessante é como essa correlação acontece de formas diferentes de acordo com as variedades. Essa enzima pode ser regulada por outros genes, como por exemplo o *phoA* (SHINAGAWA et al., 1983), portanto a intensidade da correlação em UM indica que essa é a principal via de produção dessa enzima pela variedade. O processo de mineralização de P, que converte P orgânico em P inorgânico por meio da ação de enzimas (EIVAZI; TABATABAI, 1977), também pode ser inferido a partir da correlação positiva entre o gene *phoD* e a concentração de P inorgânico nos solos.

A relação entre a atividade da fosfatase ácida com a profundidade é semelhante à do gene *phoD*, isso porque ambas as enzimas atuam como mineralizadoras de Po, atuando em diferentes faixas de pH (EIVAZI; TABATABAI, 1977). A atividade da enzima fosfatase alcalina nas variedades flutuou, onde UR apresentou os maiores valores. Como essa enzima é produzida exclusivamente por microrganismos (MARGALEF et al., 2017), esses resultados indicam uma alteração na comunidade microbiana pela variedade, elevando os níveis de atividade da enzima mesmo em maiores profundidades do solo.

A partir da PCA, observa-se que a distribuição das variedades é influenciada por diferentes variáveis ambientais. Essa influência é suficiente para separar os agrupamentos de UM e UR, onde UM apresenta maior influência da fração Po, enquanto UR apresenta maior influência da atividade enzimática da fosfatase alcalina. Como descrito anteriormente, existe uma correlação entre a atividade da fosfatase alcalina com o gene *phoD*, que é um dos genes responsáveis por regular a expressão da enzima, porém, as variedades apresentam diferentes comportamentos nessa correlação, onde UR apresenta uma correlação mais fraca quando

comparada a UM que apresenta a correlação mais forte ($R^2=0,94$). Esse resultado reforça a ideia de que a fosfatase alcalina, presente em grande quantidade em UR, não é regulada apenas pelo gene *phoD*, indicando uma diferença genética na comunidade microbiana, que mantém a redundância funcional, porém por outras ferramentas genéticas. Além disso, o agrupamento do controle distante das variedades evidencia que há influência das variedades sob a microbiota do solo, onde a distribuição do controle é fortemente influenciada pela quantificação do gene 16S de Achaea e Bacteria, que por não apresentar plantas influenciando na microbiota, é muito mais dependente da ciclagem do P por vias microbianas, além de ser um ambiente de elevada competitividade (CARDOSO, 2005).

Quando avançamos para a profundidade de 10-20cm, as variedades UI, UP e UM se agrupam na região central do gráfico, enquanto a distribuição de UR permanece sendo dirigida pela atividade enzimática da enzima fosfatase alcalina. Porém, nessa profundidade, a distribuição da variedade também é influenciada pela quantificação do gene *phoD*, indicando que pode haver diferentes grupos microbianos atuando na produção de fosfatase alcalina, dependendo da profundidade. Esses resultados reforçam que UR consegue influenciar a comunidade microbiana à uma profundidade maior comparada às outras variedades. Já na profundidade de 20-30cm todas as variedades se agrupam na região central do gráfico, indicando que a diferença entre as variedades é suavizada pela profundidade do solo. Porém, ainda nessa profundidade, há uma separação das variedades e do controle, indicando que as variedades conseguem alterar o ambiente do solo até pelo menos uma profundidade de 30cm.

6.2 Caracterização metagenômica da comunidade microbiana

Os filos Actinobacteria e Proteobacteria apresentam dominância em termos de abundância relativa, como comumente observado em amostras de solo (DENG et al., 2018), seguidos por Firmicutes e Planctomycetota. Solos menos férteis demonstram uma maior prevalência de Actinobacteria em comparação com outros tipos de solo, influenciados pelas propriedades do solo, teor de nutrientes e práticas de uso da terra (MUTAI; NJUGUNA; GHIMIRE, 2017; TAPIA-TORRES et al., 2016). Por outro lado, o filo Proteobacteria representa o filo mais amplo e diverso conhecido. Ele desempenha um papel fundamental em diversos ambientes do solo, contribuindo significativamente para os ciclos biogeoquímicos (BERGKEMPER et al., 2016; PARK et al., 2022).

Um estudo realizado em ambientes agrícolas diversos constatou que o filo Firmicutes desempenha um papel crucial na regulação da disponibilidade e ciclagem do fósforo (P) no solo (OLIVERIO et al., 2020). Esse filo influencia significativamente a disponibilidade de P no solo,

umentando o P acessível às plantas por meio da mineralização e solubilização, bem como diminuindo as perdas de P por imobilização (TIMOFEEVA; GALYAMOVA; SEDYKH, 2022). O filo Planctomycetota contribui para o ciclo biogeoquímico do P por meio da mineralização do fósforo orgânico, tornando-o mais acessível às plantas (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017). Sendo assim, esse filo gerencia efetivamente a deficiência de fósforo e reduz a dependência de fertilizantes químicos, que têm impactos ambientais negativos.

A profundidade do solo cria um forte gradiente físico-químico que afeta os microrganismos do solo. As condições ambientais variam com a profundidade do solo, atuando como um filtro ecológico que influencia a abundância e diversidade dos organismos que habitam as camadas mais profundas do solo (WEIL; BRADY, 2016). Fatores como pH, temperatura e teor de matéria orgânica também variam com a profundidade do solo, influenciando a diversidade microbiana e resultando em menor biomassa microbiana nas camadas mais profundas do solo (FENG et al., 2019; WALTERS; MARTINY, 2020). Curiosamente, com base na diversidade alfa, a diversidade microbiana de UI não é afetada pela profundidade, enquanto as outras variedades parecem diminuir a diversidade alfa com o aumento da profundidade do solo. Em relação a beta diversidade, o agrupamento de UI pode ser atribuído a diferenças fenotípicas decorrentes de programas de melhoramento de plantas, que, por sua vez, afetam a complexidade das interações hospedeiro-microbiota (CONTRERAS-LIZA, 2021; GOPAL; GUPTA, 2016; ROSSMANN et al., 2020).

Com base no *heatmap*, é possível observar uma correlação positiva entre os filios Proteobacteria, Bacteroidetes e Gemmatimonadetes com as frações de P. Um estudo sobre rotações de leguminosas e seu impacto nas comunidades microbianas funcionais do solo envolvidas na transformação de fósforo, demonstrou que Proteobacteria e Gemmatimonadetes desempenham papéis significativos no ciclo microbiano do P (YU et al., 2021). Esses filios apresentam adaptabilidade a diferentes características do solo, permitindo-lhes solubilizar e mineralizar compostos de P e facilitar a absorção de P pelas plantas, aumentando as frações de P lábeis. A correlação entre Proteobacteria e as frações de P é mais forte em UM e UR em comparação com as outras variedades, enquanto a interação entre Bacteroidetes é mais evidente em UM e UP. Um estudo constatou que os Bacteroidetes associados a plantas geralmente carecem de transportadores de fósforo orgânico comuns e transportadores para Pi, mas possuem complexos induzíveis por baixo Pi, indicando que os Bacteroidetes favorecem um mecanismo alternativo de aquisição de fósforo orgânico (LIDBURY et al., 2021), além disso, também estão associados à mobilização de fósforo na rizosfera, um nutriente limitante nesse ambiente por conta de sua baixa mobilidade (PAN; RAAIJMAKERS; CARRIÓN, 2023). Da mesma forma,

o filo Spirochaetes correlaciona-se positivamente com as frações de fósforo do solo apenas na variedade UP. Esse filo apresenta a capacidade de mineralizar compostos de fósforo orgânico e liberar enzimas fosfatases extracelulares para mineralização de P (CABUGAO et al., 2017; WANG et al., 2021). Como essas correlações surgem apenas na variedade UP, isso pode indicar que essa variedade pode ter uma habilidade singular de recrutar esses microrganismos. Da mesma forma, Acidobacteria correlaciona-se positivamente com as frações de fósforo do solo no controle devido ao seu envolvimento na mineralização de compostos de fósforo orgânico e liberação de enzimas fosfatases extracelulares (HEGYI; NGUYEN; POSTA, 2021; UWITUZE et al., 2022). Uma vez que o controle carece de enzimas advindas de plantas, esse filo pode atuar como um filo importante na ciclagem microbiana de P a partir de matéria orgânica e do P imobilizado por microrganismos.

A partir da análise da correlação de genes funcionais e frações de P, fica claro que há uma forte influência do regulon *pho* em todas as variedades avaliadas. Esses genes também são os mais abundantes nas amostras de solo. O regulon *pho* compreende os genes *phoB*, *phoR* e *phoP*, que controlam coletivamente a resposta à limitação de fosfato (SANTOS-BENEIT, 2015). O gene *phoR* atua como uma quinase sensora, detectando a concentração de Pi no ambiente. Quando os níveis de Pi estão baixos, o *phoR* sofre autofosforilação e ativa o gene *phoB* transferindo o grupo fosfato (LI et al., 2022). Como um regulador de resposta, o *phoB* se liga ao DNA e regula a expressão de genes associados à captação, transporte e metabolismo de Pi. Outro regulador de resposta, o *phoP*, forma um complexo com *phoR*, ativando a expressão gênica em resposta à limitação de Pi (PARK et al., 2022). Ele também regula genes relacionados à virulência, resposta ao estresse e vias metabólicas. O regulon *pho* de dois componentes desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase do Pi e na adaptação à limitação de Pi, controlando a expressão de genes relacionados ao Pi e outros processos celulares (OLIVERIO et al., 2020). Portanto, as correlações apresentadas indicam que as variedades apresentaram uma microbiota responsiva a situações de falta de Pi.

Uma forte correlação positiva é observada entre a fração de P lábil e os genes *phoB* e *phnN* na variedade UP. O gene *phnN* faz parte do operon *phn*, que consiste em 14 genes envolvidos na utilização de fosfonatos como fonte de fósforo. Esse operon é induzido durante a limitação de Pi e é necessário para a utilização de fosfonatos (ZENG et al., 2022). Esse resultado indica que essa variedade pode recrutar uma microbiota mais responsiva para lidar com situações de escassez de P, por apresentar for correlação da fração lábil do P com dois reguladores de estresse.

O gene *ppa* demonstra uma forte correlação com a variedade UM. Esse gene codifica a pirofosfatase inorgânica, uma enzima responsável pela hidrólise de compostos de polifosfato (poli-P) em fosfato inorgânico (DAI et al., 2020; WU et al., 2022). Esse processo facilita a solubilização de fosfato inorgânico, tornando-o disponível para a absorção pelas plantas, indicando uma estratégia diferente dessa variedade na absorção de P por meio da interação planta-microbiota. Por outro lado, o controle exibe uma correlação forte entre a fração de P inorgânico e o gene *phpC*, que está envolvido no metabolismo de fosfonato e fosfinato, que envolve a captação de fosfato pelas bactérias, a estabilização da microbiota do solo e a síntese e catabolismo de compostos orgânicos (OLIVERIO et al., 2020; XUN et al., 2021). Como esse gene não se correlaciona com nenhuma outra variedade, ele pode desempenhar um papel importante na ciclagem do P do *bulk soil*, que não depende de plantas, mas depende fortemente da microbiota e do P microbiano. Esses resultados enfatizam as estratégias específicas de cada variedade empregadas para a absorção de P.

Há uma forte correlação entre a MOS (Matéria Orgânica do Solo), o pH e o regulon *pho* em todas as variedades, mas isso é mais evidente no controle, indicando uma forte influência dessas características do solo na regulação da expressão de genes envolvidos no ciclo do P, principalmente na ausência de plantas, quando o ciclo de P depende fortemente do P imobilizado pela microbiota.

Em relação à distribuição das variedades para estratégias de absorção de P, com base na db-RDA, é possível notar que a UR é mais dependente do regulon *phoB* e do gene *gcd*. O gene *gcd* codifica a glicose desidrogenase, que é uma enzima importante envolvida na solubilização de fosfato inorgânico recalcitrante. A abundância normalizada do gene *gcd* é frequentemente usada como indicador de solubilização de P nas comunidades microbianas do solo (LIANG et al., 2020; WANG et al., 2021). No lado oposto do RDA, a variedade UI está altamente relacionada ao gene *cmk*, que é necessário para a taxa normal de replicação em *Escherichia coli*, e seu produto, quinase de citidilato, é necessário para a síntese de CDP, que é um precursor para a síntese de DNA (FRICKE et al., 1995), o que pode explicar a relação entre essa variedade e a quantificação do gene 16S das bactérias. A falta de correlação fortes de UI com genes específicos do ciclo do P indica que essa variedade é mais dependente de uma comunidade microbiana generalista, enquanto as outras variedades podem recrutar uma comunidade microbiana mais especializada para lidar com baixos níveis de P no solo.

Em relação à influência da profundidade do solo nos genes funcionais envolvidos no ciclo do fósforo, a primeira camada do solo, conhecida por sua alta atividade microbiana, mostra associações com o gene *cmk* e o regulon *pho*. No entanto, essa influência enfraquece com o aumento da profundidade do solo, onde maiores profundidades tornam-se mais relacionadas ao gene 16S de Archaea e ao gene *pqqC* quantificado por qPCR. Esses resultados indicam uma influência significativa dos genes associados à atividade microbiana e à resposta a escassez de P na camada mais superficial do solo. No entanto, à medida que a profundidade aumenta, essa influência diminui. Em camadas mais profundas do solo, caracterizadas por condições ambientais mais adversas e disponibilidade limitada de nutrientes, o ciclo do fósforo passa a ser cada vez mais influenciado por Archaea e pelo processo de solubilização de fósforo mediado pelo gene *pqqC*. Essas descobertas sugerem que as comunidades microbianas se adaptam às condições específicas predominantes em diferentes profundidades do solo, com capacidades funcionais e padrões de expressão gênica distintos. A prevalência de genes responsivos ao estresse na camada superficial destaca a importância das adaptações microbianas às condições ambientais dinâmicas, enquanto a crescente influência de Archaea e dos genes de solubilização de fósforo em camadas mais profundas do solo enfatiza seu potencial papel na aquisição e ciclagem de nutrientes em ambientes limitados em nutrientes.

A partir das redes de correlação, observa-se que o número de nós em todas as *networks* foi semelhante, além disso, apresentam um total de 98,2% de nós compartilhados entre todas as *networks*, o que indica uma composição muito semelhante para todas as redes. Com base nos resultados, nota-se que UM apresenta uma *network* mais complexa, com um maior número de arestas e nós em comparação com as outras variedades. Isso pode indicar uma maior diversidade de interações entre os táxons microbianos na rizosfera dessa variedade específica. No entanto, em termos de estrutura da *network*, UP demonstrou uma rede mais estruturada, com um maior número de módulos e uma maior modularidade. A presença de módulos indica a formação de grupos de nós altamente interconectados, com alguma independência em relação a outros grupos. Isso sugere uma estrutura mais organizada e especializada na comunidade microbiana da variedade. Esses resultados indicam que, enquanto outras variedades podem apresentar uma comunidade microbiana mais generalista, a variedade UP apresenta uma comunidade microbiana mais especializada. No entanto, é importante notar que o maior número de arestas positivas na rede da variedade UP pode representar um desafio em situações de mudanças ambientais. A dependência entre os nós pode levar a efeitos em cascata,

em que alterações em um nó podem afetar diretamente outros nós, potencialmente influenciando a estabilidade da comunidade microbiana.

Apesar do grande número de nós compartilhados, cada *network* exibiu interações distintas entre os nós, sendo que apenas 0,1% das interações foram compartilhadas. Essa descoberta indica uma influência significativa das variedades no comportamento da microbiota do solo. Na interseção dessas redes, observou-se que a interação entre *Pseudomonas* e *Azospirillum* ocorreu consistentemente em todas as redes avaliadas, sugerindo que essa interação pode desempenhar um papel crucial na estruturação das comunidades microbianas, independentemente da variedade de *Urochloa*. Essa descoberta destaca a importância de interações microbianas específicas na estrutura e funcionamento da comunidade no ecossistema do solo. Esses filões são ambas bactérias do solo que desempenham papéis importantes no ciclo de nutrientes, incluindo o ciclo do fósforo. Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecida por sua capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos, tornando-os disponíveis para a absorção pelas plantas (LIDBURY et al., 2017). Por outro lado, bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas por sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, o que também pode beneficiar o crescimento das plantas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Embora haja pesquisas limitadas sobre a interação específica entre *Pseudomonas* e *Azospirillum* no solo, é provável que elas possam trabalhar juntas para melhorar o crescimento das plantas e a absorção de nutrientes. Por exemplo, *Pseudomonas* podem solubilizar fosfatos inorgânicos, tornando-os disponíveis para a absorção pelas plantas, enquanto *Azospirillum* fixam nitrogênio atmosférico, fornecendo uma fonte de nitrogênio para a planta, ambos agindo como rizobactérias promotoras do crescimento das plantas e atuando em ciclos biogeoquímicos fundamentais ao desenvolvimento vegetal, o que pode explicar seu papel central nas *networks* microbianas.

Além disso, é importante destacar que, apesar de não serem os mais abundantes, as interações envolvendo Acidobacteria mostraram-se altamente importantes para as interações das redes no geral. Embora Acidobacteria possa ter uma abundância relativa menor em comparação com outros táxons, sua importância nas comunidades microbianas do solo não pode ser ignorada. As acidobacterias desempenham papéis cruciais no ambiente do solo, principalmente na degradação de carboidratos complexos e no ciclo da matéria orgânica, o que tem implicações diretas nos ciclos biogeoquímicos, incluindo o ciclo do fósforo (BARNS; TAKALA; KUSKE, 1999). Além disso, sua característica de ser um microrganismo oligotrófico torna esse filo de grande interesse de estudo para inoculação bacteriana visando à restauração de solos degradados (KALAM et al., 2020).

Juntos, esses resultados confirmam a hipótese inicial, de que o melhoramento genético de variedades de *Urochloa*, altera a estrutura da comunidade microbiana e as interações entre planta-microbiota, levando a uma alteração significativa nas estratégias de disponibilização e absorção de P pelas variedades avaliadas, destacando assim a necessidade dos programas de melhoramento genético que incorporarem estudo que levem em consideração a interação complexa entre as plantas e sua microbiota associada. Essa abordagem integrada promete o desenvolvimento de variedades mais eficazes, capazes de aproveitar uma microbiota benéfica para alcançar efetivamente os objetivos de melhoria almejados, levando assim ao desenvolvimento de práticas de manejo e recuperação de pastagens que sejam mais sustentáveis.

7. CONCLUSÕES

Este estudo contribui para a compreensão do impacto de diferentes variedades de *Urochloa* na comunidade microbiana do solo e no ciclo biogeoquímico do fósforo. As descobertas destacam a importância das interações entre as plantas e a microbiota associada para a disponibilização e transporte do nutriente.

O estudo fornece informações sobre os genes funcionais e as vias metabólicas envolvidas na ciclagem do fósforo pela microbiota associada às variedades de *Urochloa* em diferentes profundidades do solo, por exemplo, quando foi observada uma relação crescente entre as maiores profundidades e o gene *pqqC*, bem como a quantificação de Archaea por qPCR.

A variedade BRS Paiaguás se mostrou especialmente promissora, apresentando uma microbiota responsiva a diferentes estratégias para absorção de P, além de apresentar características nutricionais superiores e maior produção de biomassa. Porém, a *U. ruziziensis* se destaca pela significativa manutenção da atividade da fosfatase alcalina nas maiores profundidades (até 30 cm) em relação às demais variedades.

Na análise de co-ocorrências, observou-se influência significativa das variedades no comportamento da microbiota do solo. Na interseção dessas redes, observou-se que a interação entre *Pseudomonas* e *Azospirillum* ocorreu consistentemente em todas as redes avaliadas, sugerindo que essa interação pode desempenhar um papel crucial na estruturação das comunidades microbianas, independentemente da variedade de *Urochloa*.

É importante ressaltar que a resposta das comunidades microbianas do solo microbianas às variedades de *Urochloa* variaram, como evidenciado pela divergência da variedade Ipyporã em relação às outras, levantando indícios de que há influência do melhoramento genético de *Urochloa* na microbiota do solo.

REFERÊNCIAS

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–8, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00971.

AN, R.; MOE, L. A. Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 16, p. 4955–4964, 2016. DOI: 10.1128/AEM.00813-16.

BAPTISTELLA, J. L. C. et al. Urochloa in Tropical Agroecosystems. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3389/fsufs.2020.00119.

BARNS, S. M.; TAKALA, S. L.; KUSKE, C. R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1731–1737, 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1731-1737.1999. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.65.4.1731-1737.1999>.

BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. In: International AAAI Conference on Web and Social Media, 3., 2009, San Jose, CA. **Proceedings...** Washington, DC: Association for the Advancement of Artificial Intelligence, 2009. p. 361–362. DOI: 10.1609/icwsm.v3i1.13937. Disponível em: <https://ojs.aaai.org/index.php/ICWSM/article/view/13937>.

BENEDETTO, A.; MAGURNO, F.; BONFANTE, P.; LANFRANCO, L. Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza**, v. 15, n. 8, p. 620–627, 2005. DOI: 10.1007/s00572-005-0006-9.

BERGKEMPER, F. et al. Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 125, p. 91–97, 2016. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.04.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.04.011>.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 333, n. 1, p. 1–13, 2004. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.054.

BÜNEMANN, E. K. Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89, p. 82–98, 2015. DOI: 10.1016/j.soilbio.2015.06.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.026>.

CABUGAO, K. G. et al. Root and rhizosphere bacterial phosphatase activity varies with tree species and soil phosphorus availability in Puerto Rico tropical forest. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–14, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01834.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4516–4522, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1000080107.

CARDOSO, E. J. B. N. **Biologia do solo**. 2005. Aulas.

CONTRERAS-LIZA, S. E. Plant Breeding and Microbiome. In: ABDURAKHMONOV, I. Y. (org.). **Plant Breeding**. Rijeka: IntechOpen, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.94948. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.94948>.

CORDELL, D.; DRANGERT, J. O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, v. 19, n. 2, p. 292–305, 2009. DOI: 10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009.

COSTA, N. De L. et al. Efeito de micorrizas arbusculares sobre o crescimento e nutrição mineral de *Brizantha* CV. Marandu. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 406–411, 2012. DOI: 10.5216/cab.v13i4.8665.

- CUI, H. et al. The combined effects of cover crops and symbiotic microbes on phosphatase gene and organic phosphorus hydrolysis in subtropical orchard soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 82, p. 119–126, 2015. DOI: 10.1016/j.soilbio.2015.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.003>.
- DAI, Z. et al. Long-term nutrient inputs shift soil microbial functional profiles of phosphorus cycling in diverse agroecosystems. **The ISME Journal**, v. 14, n. 3, p. 757–770, 2020. DOI: 10.1038/s41396-019-0567-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0567-9>.
- DEAN, W.; SCHWARTZ, S. B. **With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest**. Berkeley, CA: University of California Press, 1997.
- DENG, J. et al. Variations in Soil Bacterial Community Diversity and Structures Among Different Revegetation Types in the Baishilazi Nature Reserve. **Frontiers in microbiology**, v. 9, art. 2874, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02874.
- DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36 p. (Documentos, 402). Disponível em: www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online.
- DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de Pastagens** : o que é e como evitar. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 19 p. Disponível em: <http://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>.
- DOS SANTOS, Í. P. A. et al. Influência do fósforo, micorriza e nitrogênio no conteúdo de minerais de *Brachiaria brizantha* e *Arachis pintoi* consorciados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 605–616, 2002. DOI: 10.1590/s1516-35982002000300010.
- EIVAZI, F.; TABATABAI, M. Phosphates in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 9, n. 1969, p. 167–172, 1977.
- EMBRAPA. **Brachiaria brizantha - BRS Paiaguás**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/892/brachiaria-brizantha--brs-paiaguas>. Acesso em: 21 maio. 2023.
- FENG, H. et al. Soil depth determines the composition and diversity of bacterial and archaeal communities in a poplar plantation. **Forests**, v. 10, n. 7, 2019. DOI: 10.3390/f10070550. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4907/10/7/550>.
- FRICKE, J. et al. The cmk gene encoding cytidine monophosphate kinase is located in the rpsA operon and is required for normal replication rate in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 3, p. 517–523, 1995. DOI: 10.1128/jb.177.3.517-523.1995.
- FRIEDMAN, J.; ALM, E. J. Inferring Correlation Networks from Genomic Survey Data. **PLOS Computational Biology**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2012. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002687. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002687>.
- GATIBONI, L. C.; CONDRON, L. M. A rapid fractionation method for assessing key soil phosphorus parameters in agroecosystems. **Geoderma**, v. 385, art. 114893, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114893>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706120326483>.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, n. 3, p. 489–500, 1980. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.
- GOLDSTEIN, A. H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 12, n. 2, p. 185–193, 1995. DOI: 10.1080/01448765.1995.9754736.
- GOPAL, M.; GUPTA, A. Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–10, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01971.

HEGYI, A.; NGUYEN, T. B. K.; POSTA, K. Metagenomic Analysis of Bacterial Communities in Agricultural Soils from Vietnam with Special Attention to Phosphate Solubilizing Bacteria. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9091796. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/9/1796>.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173–195, 2001.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-Solubilization mechanisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 257–263, 1995. DOI: 10.1016/0038-0717(94)00190-C.

JANEGITZ, M. C.; INOUE, B. S.; ROSOLEM, C. A. Formas de fósforo no solo após o cultivo de braquiária e tremoço branco. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p. 1381–1386, 2013. DOI: 10.1590/S0103-84782013000800007.

JANEGITZ, M. C.; ROSOLEM, C. A.; Ferreira-Eloy, N. R. Espécies de Urochloa afetam diferencialmente a disponibilidade de fósforo no solo. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n. 2, p. 34–40, 2017. DOI: 10.5747/ca.2017.v13.n2.a158.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: Ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459–473, 2014. DOI: 10.1111/nph.12989.

KALAM, S. et al. Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.580024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.580024>.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. **Microbial strategies for crop improvement**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. 358 p. DOI: 10.1007/978-3-642-01979-1.

LEITE, H. M. F. et al. Cover crops shape the soil bacterial community in a tropical soil under no-till. **Applied Soil Ecology**, v. 168, p. 104166, 2021. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.104166. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104166>.

LI, Yi et al. Different mechanisms driving increasing abundance of microbial phosphorus cycling gene groups along an elevational gradient. **iScience**, v. 25, n. 10, art. 105170, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105170>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004222014420>.

LIANG, J.-L. et al. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. **The ISME Journal**, v. 14, n. 6, p. 1600–1613, 2020. DOI: 10.1038/s41396-020-0632-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0632-4>.

LIDBURY, I. D. E. A. et al. Identification of extracellular glycerophosphodiesterases in *Pseudomonas* and their role in soil organic phosphorus remineralisation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, art. 2179, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02327-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02327-6>.

LIDBURY, I. D. E. A. et al. Niche-adaptation in plant-associated Bacteroidetes favours specialisation in organic phosphorus mineralisation. **The ISME Journal**, v. 15, n. 4, p. 1040–1055, 2021. DOI: 10.1038/s41396-020-00829-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00829-2>.

LIU, C. et al. microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 2, 2021. DOI: 10.1093/femsec/fiaa255.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MALDONADO-MENDOZA, I. E.; DEWBRE, G. R.; HARRISON, M. J. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 10, p. 1140–1148, 2001. DOI: 10.1094/MPMI.2001.14.10.1140.

- MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 1, p. 7–14, 2007. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.06.016.
- MARGALEF, O. et al. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-01418-8.
- MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. de C. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012.
- MENDES, I. de C.; REIS JÚNIOR, F. B. dos. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 26 p. (Documentos, 85).
- MENDES, I. de C.; SOUSA, D. M. G. de; REIS JÚNIOR, F. B. dos. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 32, n. 1/2, p. 185–203, 2015. Disponível em: <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/cct/article/view/23311/13164>.
- MENDES, L. W. et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151–160, 2015. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.06.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.005>.
- MENDES, L. W. et al. Breeding for soil-borne pathogen resistance impacts active rhizosphere microbiome of common bean. **ISME Journal**, v. 12, n. 12, p. 3038–3042, 2018. DOI: 10.1038/s41396-018-0234-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-018-0234-6>.
- MENDIBURU, F.; SIMON, R. Agricolae -Ten years of an Open source Statistical tool for experiments in Breeding, agriculture and biology. **PeerJ PrePrints**, v. 3, e1404v1, 2015. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1404v1>. DOI: 10.7287/peerj.preprints.1404v1.
- MEYER, J. B. et al. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene pqqC, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7345–7354, 2011. DOI: 10.1128/AEM.05434-11.
- MOMESSO, L. et al. Forage grasses steer soil nitrogen processes, microbial populations, and microbiome composition in a long-term tropical agriculture system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 323, art. 107688, 2022. DOI: 10.1016/j.agee.2021.107688. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107688>.
- MUTAI, C.; NJUGUNA, J.; GHIMIRE, S. Brachiaria Grasses (Brachiaria spp.) harbor a diverse bacterial community with multiple attributes beneficial to plant growth and development. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 5, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1002/mbo3.497.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000. DOI: 10.1038/35002501. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35002501>.
- NAKATANI, A. S. et al. Microbial communities, enzymatic activity and mycorrhizal fungi in rhizospheric soil used for landfarming of petrochemical waste. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1501–1512, 2008. DOI: 10.1590/s0100-06832008000400014.
- NASSAL, D. et al. Effects of phosphorus-mobilizing bacteria on tomato growth and soil microbial activity. **Plant and Soil**, v. 427, n. 1, p. 17–37, 2018. DOI: 10.1007/s11104-017-3528-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3528-y>.
- NUNES, S. G. et al. **Brachiaria brizantha cv. Marandu**. Campo Grande, MS: EMBRAPA - CNPG, 1984. 31 p. (Documentos, 21). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/317899/1/Brachiariabrizantha.pdf>.

O'LEARY, N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. D733-45, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1189.

OBERSON, A. et al. Phosphorus transformations in an Oxisol under contrasting land-use systems: The role of the soil microbial biomass. **Plant and Soil**, v. 237, n. 2, p. 197–210, 2001. DOI: 10.1023/A:1013301716913.

OKSANEN, J. et al. **Vegan**: Community Ecology Package. Vienna: R Package Version 2.2-1, v. 2, p. 1–2, 2015.

OLANDER, L. P.; VITOUSEK, P. M. Biological and geochemical sinks for phosphorus in soil from a wet tropical forest. **Ecosystems**, v. 7, n. 4, p. 404–419, 2004. DOI: 10.1007/s10021-004-0264-y.

OLIVERIO, A. M. et al. The role of phosphorus limitation in shaping soil bacterial communities and their metabolic capabilities. **mBio**, v. 11, n. 5, 2020. DOI: 10.1128/mbio.01718-20. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mbio.01718-20>.

PAN, X.; RAAIJMAKERS, J. M.; CARRIÓN, V. J. Importance of Bacteroidetes in host–microbe interactions and ecosystem functioning. **Trends in Microbiology**, v. 10, 2023. DOI: 10.1016/j.tim.2023.03.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.03.018>.

PARK, Y. et al. Strategies of organic phosphorus recycling by soil bacteria: acquisition, metabolism, and regulation. **Environmental Microbiology Reports**, v. 14, n. 1, p. 3–24, 2022a. DOI: 10.1111/1758-2229.13040.

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O.; SANTOS, J. G. D. Symbiotic compatibility of arbuscularmycorrhizal fungi with tropical tree species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 3, p. 413–424, 2006. DOI: 10.1590/s0100-06832006000300003.

RAIJ, B. Van et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001.

RESENDE, R. M. S. et al. **Melhoramento de *Brachiaria ruziziensis* Germain & Evrard (sin. *Urochloa ruziziensis*) autotetraploide**: resultados da avaliação genética de subpopulações, progênies e indivíduos. Brasília, DF: Embrapa, 2016. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 37). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1061080/melhoramento-de-brachiaria-ruziziensis-germain--evrard-sin-urochloa-ruziziensis-autotetraploide-resultados-da-avaliacao-genetica-de-subpopulacoes-progenies-e-individuos>.

RILLIG, M. C. et al. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, v. 233, n. 2, p. 167–177, 2001. DOI: 10.1023/A:1010364221169.

ROSSMANN, M. et al. Multitrophic interactions in the rhizosphere microbiome of wheat: from bacteria and fungi to protists. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 4, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1093/femsec/fiaa032. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article/doi/10.1093/femsec/fiaa032/5775476>.

SAKURAI, M. et al. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 62–71, 2008. DOI: 10.1111/j.1747-0765.2007.00210.x.

SANTOS-BENEIT, F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00402. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00402>.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1117018109.

SHINAGAWA, H. et al. Regulation of the pho regulon in *Escherichia coli* K-12: Genetic and physiological regulation of the positive regulatory gene *phoB*. **Journal of Molecular Biology**, v. 168, n. 3, p. 477–488, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80297-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80297-6). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283683802976>.

- SILES, J. A. et al. Distribution of phosphorus cycling genes across land uses and microbial taxonomic groups based on metagenome and genome mining. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 74, art. 108826, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108826>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071722002838>.
- SMITH, S.; READ, D. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3. ed. New York: Academic Press, 2008.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00036-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016864450000036X>.
- TAN, H. et al. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the phoD phosphorus mineraliser group in pasture soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 6, p. 661–672, 2013. DOI: 10.1007/s00374-012-0755-5.
- TAPIA-TORRES, Y. et al. How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: Lessons from bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4652–4662, 2016. DOI: 10.1128/AEM.00160-16.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, 2020. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.
- TIMOFEEVA, A.; GALYAMOVA, M.; SEDYKH, S. Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 16, 2022. DOI: 10.3390/plants11162119.
- TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 442–446, 2008. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.011.
- UWITUZE, Y. et al. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, and Extracellular Soil Enzyme Responses to Different Land Use. **Frontiers in Soil Science**, v. 2, 2022. DOI: 10.3389/fsoil.2022.814554.
- VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. de. Tendências e perspectivas da pecuária bovina na amazônia brasileira. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, n. 8, p. 7–30, 2009. Disponível em: [http://www.cofecon.org.br/dmdocuments/docComissoes/publicacao\(2\).pdf](http://www.cofecon.org.br/dmdocuments/docComissoes/publicacao(2).pdf).
- VALLE, C. B. do et al. **BRS Ipyporã (“belo começo” em guarani)**: híbrido de Brachiaria da Embrapa. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2017. 17 p. (Comunidade Técnico, 37). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/159958/1/BRS-Ipypora-belo-comeco-em-guarani.pdf>.
- VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v. 127, n. 2, p. 390–397, 2001. DOI: 10.1104/pp.010331.
- VELDKAMP, E. Organic Carbon Turnover in Three Tropical Soils under Pasture after Deforestation. **Soil Science Society of America Journal**, v. 58, n. 1, p. 175–180, 1994. DOI: 10.2136/sssaj1994.03615995005800010025x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10927-1>.
- WALTERS, K. E.; MARTINY, J. B. H. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0233872. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233872>.
- WANG, F. et al. Soil Microbial Community Succession Based on PhoD and Gcd Genes along a Chronosequence of Sand-Fixation Forest. **Forests**, v. 12, n. 12, 2021. DOI: 10.3390/f12121707. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4907/12/12/1707>.
- WEIL, R. R.; BRADY, N. C. **The Nature and Properties of Soils**. 15. ed. London, UK: Pearson, 2016. 1104 p. DOI: 10.2307/3894608.

WICKHAM, H. **ggplot2**. Cham: Springer International Publishing, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-24277-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24277-4>.

WOOD, D. E.; LU, J.; LANGMEAD, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, art. 257, 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1891-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>.

WU, X. et al. Genome-Resolved Metagenomics Reveals Distinct Phosphorus Acquisition Strategies between Soil Microbiomes. **mSystems**, v. 7, 2022. DOI: 10.1128/msystems.01107-21.

XUN, W. et al. Specialized metabolic functions of keystone taxa sustain soil microbiome stability. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 35, 2021. DOI: 10.1186/s40168-020-00985-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00985-9>.

YU, H. et al. Effects of Rotations With Legume on Soil Functional Microbial Communities Involved in Phosphorus Transformation. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.661100.

ZENG, J. et al. PCycDB: a comprehensive and accurate database for fast analysis of phosphorus cycling genes. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2022. DOI: 10.1186/s40168-022-01292-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01292-1>.

ZHANG, J. et al. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n.5, p. 614–620, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt593.

ZHOU, T. et al. Rhizosphere soil bacterial community composition in soybean genotypes and feedback to soil P availability. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 10, p. 2230–2241, 2019. DOI: 10.1016/S2095-3119(18)62115-X. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62115-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62115-X).

ZHOU, Y.; ZHU, H.; YAO, Q. Contrasting P acquisition strategies of the bacterial communities associated with legume and grass in subtropical orchard soil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 10, n. 3, p. 310–319, 2018. DOI: 10.1111/1758-2229.12641.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Histórico do uso do solo da área experimental, incluindo as culturas e aplicações de corretivos do solo de 2002 à 2019.

Growing season		Crops	Liming
2002/2003	Nov.	<i>Oriza sativa</i>	2000 kg ha ⁻¹ of dolomitic lime (71% ECCE [†])
	Apr.	<i>Avena strigosa</i>	
2003/2004	Jan.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-
	Apr.	<i>Avena strigosa</i>	
2004/2005	Nov.	<i>Arachis hypogaea</i>	-
	Apr.	<i>Avena sativa</i>	
2005/2006	Nov.	<i>Arachis hypogaea</i>	-
	May	<i>Avena sativa</i>	
2006/2007	Feb.	<i>Zea mays</i>	-
	Jun.	<i>Avena strigosa</i>	
2007/2008	Dec.	<i>Zea mays</i>	2500 kg ha ⁻¹ of dolomitic lime (76% ECCE [†])
	Jun.	<i>Avena sativa</i>	
2008/2009	Dec.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2009/2010	Oct.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Sorghum vulgare</i>	
2010/2011	Oct.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2011/2012	Oct.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2012/2013	Oct.	<i>Glycine max</i>	3000 kg ha ⁻¹ of dolomitic lime (88% ECCE [†])
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2013/2014	Oct.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2014/2015	Oct.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2015/2016	Oct.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2016/2017	Oct.	<i>Glycine max</i>	5000 kg ha ⁻¹ of dolomitic lime (69% ECCE)
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2017/2018	Oct.	<i>Glycine max</i>	-
	Mar.	<i>Zea mays</i>	
2018/2019	Ago.	Fallow	-
	Jan.	<i>Brachiaria varieties</i> *	

A replicação de cal foi realizada quando a saturação por bases atingiu $\leq 50\%$

[†]ECCE: effective calcium carbonate equivalents

*Começo do experimento

Fonte: Autoria própria

Tabela Suplementar 2. Textura do solo antes da implementação do experimento.

Soil Texture		
Clay	Silt (g/ Kg)	Total Sand
309	35	656

Fonte: Autoria própria

Tabela Suplementar 3. Características das variedades de *Urochloa* selecionadas neste estudo.

Varieties/ Characteristics	UR <i>Brachiaria ruziziensis</i>	UP <i>Brachiaria brizantha</i> cv. BRS Paiaguás	UM <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	UI <i>Brachiaria</i> spp. cv. Ipyporã - BRS RB331
Usage	Grazing and hay	Grazing and hay	Grazing and hay	Grazing and hay
Intercropping	All legumes	All legumes	All legumes	All legumes
Life cycle	Perennial	Perennial	Perennial	Perennial
Drought tolerance	Good	Tolerant	Good	Good
Leafhopper tolerance	Medium	Medium	High	High
Waterlogging tolerance	Medium	Medium	Low	Low
Tolerance to cold	Medium	Medium	Good	Good
Digestibility	High	High	High	Super High
Palatability	Good	Good	Good	Good
Altitude	Up to 2000m	Up to 2000m	Up to 2000m	Up to 2000m
Annual precipitation	Over 1000m	Over 800m	Over 1000m	Over 1000m
Growth habit	Clumping	Tufted	Tufted	Tufted
Germination	7 to 21 days	7 to 21 days	7 to 21 days	7 to 21 days
Planting depth	2 to 3 cm	2 to 3 cm	2 to 3 cm	2 to 6 cm
Breeding goals	High productivity and adaptation to different soils	High productivity and resistance to drought	Resistance to pasture plague insects (<i>Notozulia entreriana</i> and <i>Deois flavopicta</i>)	Resistance to pasture plague insects (<i>Notozulia entreriana</i> and <i>Deois flavopicta</i>)

Fonte: Baseado em <<https://www.pasoita.com.br/en/>> e <https://www.embrapa.br/>

Tabela Suplementar 4. Descrição dos primers utilizados na análise de qPCR.

Target genes	Sample origin	Primers	Sequences (5'-3')	Fragment length (pb)	References	Amplification condition	
qPCR	<i>16S rRNA of Bacteria</i>	Environmental DNA	Eub 338f Eub 518r	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	180	Bakke et al. (2011)	qPCR: 95°C-10 min, 40 cycles, 95°C-40s, 54°C-40s, 72°C-40s; Melting: 95°C- 15s, 55°C-1 min, 95°C-15s
	<i>16S rRNA of Archaea</i>	Environmental DNA	519F 915R	CAGCCGCCGCGGTAA GTGCTCCCCGCCAATTCCT	397	Coolen et al. (2004); Stahl, Amann (1991)	qPCR: 95°C-10 min; 40 cycles, 95°C-30s, 57°C-30s, 72°C-50s; Melting: 95°C- 15s, 57°C-1 min, 95°C-15s
	<i>ITS</i>	Environmental DNA	ITS1f ITS2	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA TCCTCCGCTTATTGATATGC	400	White et al. (1990)	qPCR: 94°C-15 min; 40 cycles, 94°C-1min, 52°C- 30s, 72°C-1min; Melting: 95°C-15s, 72°C-1 min, 96°C-15s
	<i>phoD</i>	Environmental DNA	ALPS- F730 ALPS- R1101	CAGTGGGACGACCACGAGGT GAGGCCGATCGGCATGTCG	353	Sakurai et al. (2008)	qPCR: 95°C-10 min; 40 cycles, 95°C-45s, 57°C-60s, 72°C-45s; Melting: 95°C- 15s, 60°C-1 min, 95°C-15s
	<i>pqqC</i>	Environmental DNA	pqqCf1 pqqCr1	CAGGGCTGGGTCGCCAACC CATGGCATCGAGCATGCTCC	546	Meyer et al. (2011)	qPCR: 95°C-5 min, 40 cycles, 95°C-40s, 63°C-30s, 72°C-1 min; Melting: 95°C- 15s, 57°C-1 min, 95°C-15s

Tabela Suplementar 5. Características do solo nas amostras das variedades de Urochloa. Os valores médios e desvios-padrão são baseados em 4 réplicas, os métodos estatísticos utilizados são descritos na seção de metodologia.

Soil characteristics	Treatments					p-Value
	Control	UI	UM	UP	UR	
pH (CaCl ₂)						
0-10cm	4.91±0.18	5.44±0.31	5.36±0.41	5.59±0.23	4.48±0.59	ns
10-20cm	4.10±0.08	4.29±0.25	4.27±0.31	4.33±0.29	4.70±0.57	ns
20-30cm	4.00±0.08	4.01±0.08	3.94±0.02	4.01±0.06	4.02±0.15	ns
O.M. (g /Kg)						
0-10cm	21.20±2.65	23.66±2.72	20.86±2.28	26.86±4.74	20.92±2.39	ns
10-20cm	12.60±1.24	14.08±4.51	14.31±4.41	16.13±8.55	12.65±0.96	ns
20-30cm	10.94±1.25	9.75±1.39	9.63±1.27	9.29±1.21	10.77±1.14	ns
P (mg/Kg)						
0-10cm	16.03±3.68a	34.10±12.89b	16.54±3.64a	27.75±8.73ab	39.10±15.11b	0.01
10-20cm	11.10±6.24	15.95±9.93	18.18±9.97	13.30±5.81	13.00±4.82	ns
20-30cm	5.05±3.12	4.95±2.56	3.95±1.68	3.15±0.97	7.00±2.66	ns
Labile P (mg/Kg)						
0-10cm	26±4.42	37.17±11.82	22.72±1.07	36.52±12.66	40,81±9.36	ns
10-20cm	23.48±13.76	30.91±13.72	29.62±16.72	23.83±7.75	31.49±11.48	ns
20-30cm	12.58±7.31	8.9±6.12	8.76±4.23	9.96±4.34	12.07±2.87	ns
Moderately labile P (mg/Kg)						
0-10cm	122.75±11.59	144.17±14.97	144.35±56.24	137.3±6.55	116.78±12.25	ns
10-20cm	96.5±10.43	104.84±17.81	106.22±26.29	104.99±7.39	106.42±11.35	ns
20-30cm	74.05±9.24	80.09±9.58	69.55±8.33	84.29±28.23	87.28±14.12	ns
Non labile P (mg/Kg)						
0-10cm	447.66±75.45	422.67±41.55	344.48±101.2	412.72±54.57	416.8±39.92	ns
10-20cm	403.49±78.69	333.72±135.3	407.38±30.45	320.95±91.09	433.44±50.27	ns
20-30cm	358.59±33.91	349.4±10.37	386.66±30.49	397.32±53.15	350.43±46.03	ns

K (mmol/ Kg)	0-10cm	5.13±2.69	3.90±0.87	2.16±0.72	2.35±1.04	5.09±3.32	ns
	10-20cm	1.19±0.89	0.84±0.32	0.90±0.24	1.04±0.50	2.10±2.51	ns
	20-30cm	0.74±0.40	0.48±0.10	0.51±0.09	0.63±0.13	0.68±0.29	ns
Ca (mmol/ Kg)	0-10cm	18.00±7.51	32.39±18.31	23.89±6.94	33.21±14.18	19.21±2.85	ns
	10-20cm	4.62±0.87	8.40±4.39	9.42±5.74	8.71±2.97	11.37±5.16	ns
	20-30cm	2.63±0.42	3.65±1.58	2.06±0.68	2.84±1.26	3.83±2.04	ns
Mg (mmol/ Kg)	0-10cm	11.39±7.50	20.26±15.00	12.40±2.77	21.11±13.23	11.37±2.82	ns
	10-20cm	2.68±0.30	4.05±2.08	4.29±3.20	4.61±1.31	4.95±1.90	ns
	20-30cm	1.75±0.26	1.77±0.54	1.18±0.48	1.72±0.76	2.11±1.26	ns
Al (mmol/ Kg)	0-10cm	1.42±1.35	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.57±1.14	ns
	10-20cm	9.90±0.80	6.82±3.91	7.39±4.15	5.97±2.88	3.55±3.57	ns
	20-30cm	11.79±2.29	12.50±2.78	13.92±1.70	11.93±2.90	10.94±4.43	ns
C.E.C. (mmol/ Kg)	0-10cm	64.13±16.34	76.99±31.15	59.73±6.04	75.77±27.05	55.60±2.48	ns
	10-20cm	46.68±1.64	46.96±7.67	48.68±8.04	48.11±4.08	44.97±4.46	ns
	20-30cm	45.15±2.27	45.75±3.30	45.59±3.78	40.86±3.65	46.04±5.46	ns
V (%)	0-10cm	51.69±11.64	70.06±11.57	63.78±9.33	72.44±9.26	64.26±10.75	ns
	10-20cm	18.22±2.95	27.90±11.72	29.04±15.20	30.01±9.34	41.85±17.66	ns
	20-30cm	11.36±1.34	13.00±5.22	8.27±2.75	12.49±3.81	14.90±7.98	ns
m (%)	0-10cm	5.1±4.91a	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	1.81±3.61a	0.01
	10-20cm	51.83±4.84	35.84±21.37	37.05±23.89	30.03±14.62	18.62±20.46	ns
	20-30cm	69.28±5.21	67.63±13.02	78.68±7.03	69.16±12.91	61.15±20.52	ns

Cu (mg/ Kg)							
0-10cm	4.36±0.50	4.15±0.26	3.83±0.51	3.58±0.32	3.38±0.68	ns	
10-20cm	4.13±0.40	3.92±0.30	3.71±0.50	3.54±0.27	3.21±0.59	ns	
20-30cm	4.07±0.42	3.82±0.23	3.55±0.44	3.40±0.32	3.10±0.41	ns	
Zn (mg/ Kg)							
0-10cm	0.88±0.17a	0.52±0.15bc	0.49±0.12c	0.35±0.10c	0.68±0.12a	0.001	
10-20cm	0.38±0.09	0.33±0.16	0.27±0.03	0.25±0.08	0.40±0.07	ns	
20-30cm	0.25±0.11	0.27±0.20	0.14±0.06	0.24±0.02	0.20±0.07	ns	
Soil Texture							
Clay (g/ Kg)							
0-10cm	281.75±6.60	310.50±11.00	304.00±20.05	283.00±15.68	273.00±32.65	ns	
10-20cm	303.75±21.28	320.75±17.93	323.50±32.19	303.00±17.45	283.50±23.07	ns	
20-30cm	324.00±38.36	351.75±9.74	353.50±46.02	337.50±33.21	311.00±53.97	ns	
Silt (g/ Kg)							
0-10cm	73.75±8.50	65.25±9.74	65.25±2.87	73.50±7.94	44.25±14.84	ns	
10-20cm	54.25±4.43	68.00±7.79	70.00±13.74	58.50±20.86	52.00±6.16	ns	
20-30cm	70.00±6.16	77.50±23.42	96.25±22.63	75.25±9.81	55.25±8.66	ns	
Total Sand (g/ Kg)							
0-10cm	643.75±3.86	624.00±2.94	630.75±20.19	644.00±21.21	683.00±46.12	ns	
10-20cm	641.75±17.78	611.25±23.00	607.00±44.02	638.75±33.29	664.75±27.60	ns	
20-30cm	606.00±43.23	570.50±29.65	550.25±50.94	590.25±39.91	633.50±57.44	ns	
Biological variables							
<i>pqqC</i> gene (copies/ul DNA)							
0-10cm	645±203	626±218	350±120	507±36	537±293	ns	
10-20cm	539±161	947±254	918±244	846±223	654±322	ns	
20-30cm	935±183	857±168	928±235	1026±250	837±246	ns	
<i>phoD</i> gene (copies/ul DNA)							
0-10cm	40133±19091	39843±10942	43301±18846	50312±30890	32683±10888	ns	
10-20cm	18270±2093	16664±6439	12292±6204	9386±1655	22403±14751	ns	
20-30cm	14044±8937	9867±7468	4693±989	8042±510	4306±2446	ns	

Archaea 16S gene copies (copies/ul DNA)						
0-10cm	15381±3059a	9993±2007b	6219±2342c	5872±1509c	2615±643d	0.01
10-20cm	23475±5058a	15935±2054bc	19219±2426ab	19386±6707ab	6439±911bc	0.01
20-30cm	25802±4647a	14407±4656b	17118±6025ab	22013±5837a	14447±4345b	0.05
Bacteria 16S gene copies (copies/ul DNA)						
0-10cm	26314±6690a	16099±5307b	17421±5585b	18469±5707ab	8426±2017c	0.01
10-20cm	19317±4565	22736±10107	15601±1554	15210±3275	13354±5641	ns
20-30cm	23691±3184a	22108±4695a	11992±3960b	15362±1777b	13493±1827b	0.001
Fungi ITS gene copies (copies/ul DNA)						
0-10cm	4933±780	6844±1219	6149±2435	4825±2208	6434±878	ns
10-20cm	2628±426a	7529±1651b	6898±1655b	4361±2896ab	2499±784a	0.01
20-30cm	2387±786	4770±2524	4136±848	3925±2467	3585±2765	ns
Acid phosphatase activity (ug p-nitrofenol/g h-1)						
0-10cm	61±37a	118±40ab	114±74ab	214±82b	154±83ab	0.05
10-20cm	22±19	64±48	34±34	62±20	51±34	ns
20-30cm	30±26	61±42	48±25	82±72	13±9	ns
Alkaline phosphatase activity (ug p-nitrofenol/g h-1)						
0-10cm	79±34b	92±31b	90±19b	125±22ab	158±47a	0.001
10-20cm	40±2c	60±2bc	43±2c	71±5b	156±38a	0.001
20-30cm	44±4b	68±6b	48±1b	67±8b	102±32a	0.001
AMF colonization (%)	ne	43±1d	60±2a	51±1b	47±1c	0.001
Dry mass (g)	ne	84±12ab	71±24ab	94±49a	47±18b	0.01
Plant P (g kg ⁻¹)	ne	42±7b	35±12b	77±39a	24±8b	0.05

Legenda: UI: *Urochloa spp.* BRS Ipyporã; UP: *Urochloa brizantha* BRS Paiaguás; UM: *Urochloa brizantha* cv. Marandu; UR: *Urochloa ruziziensis*; ne: Not evaluated; ns: Not significant. Different letters indicate difference among genotypes in the evaluated depth. Differences among depths were not evaluated.

Fonte: Autoria propria.

Tabela Suplementar 6. Resultados do teste de similaridade de Jaccard com base nos nós das redes de co-ocorrência.

	UR	UP	UM	UI	Control
UR	0	0.988304	0.011696	0.017544	0.017544
UP	0.988304	0	0.988166	0.988095	0.988095
UM	0.011696	0.988166	0	0.005917	0.005917
UI	0.017544	0.988095	0.005917	0	0
Control	0.017544	0.988095	0.005917	0	0

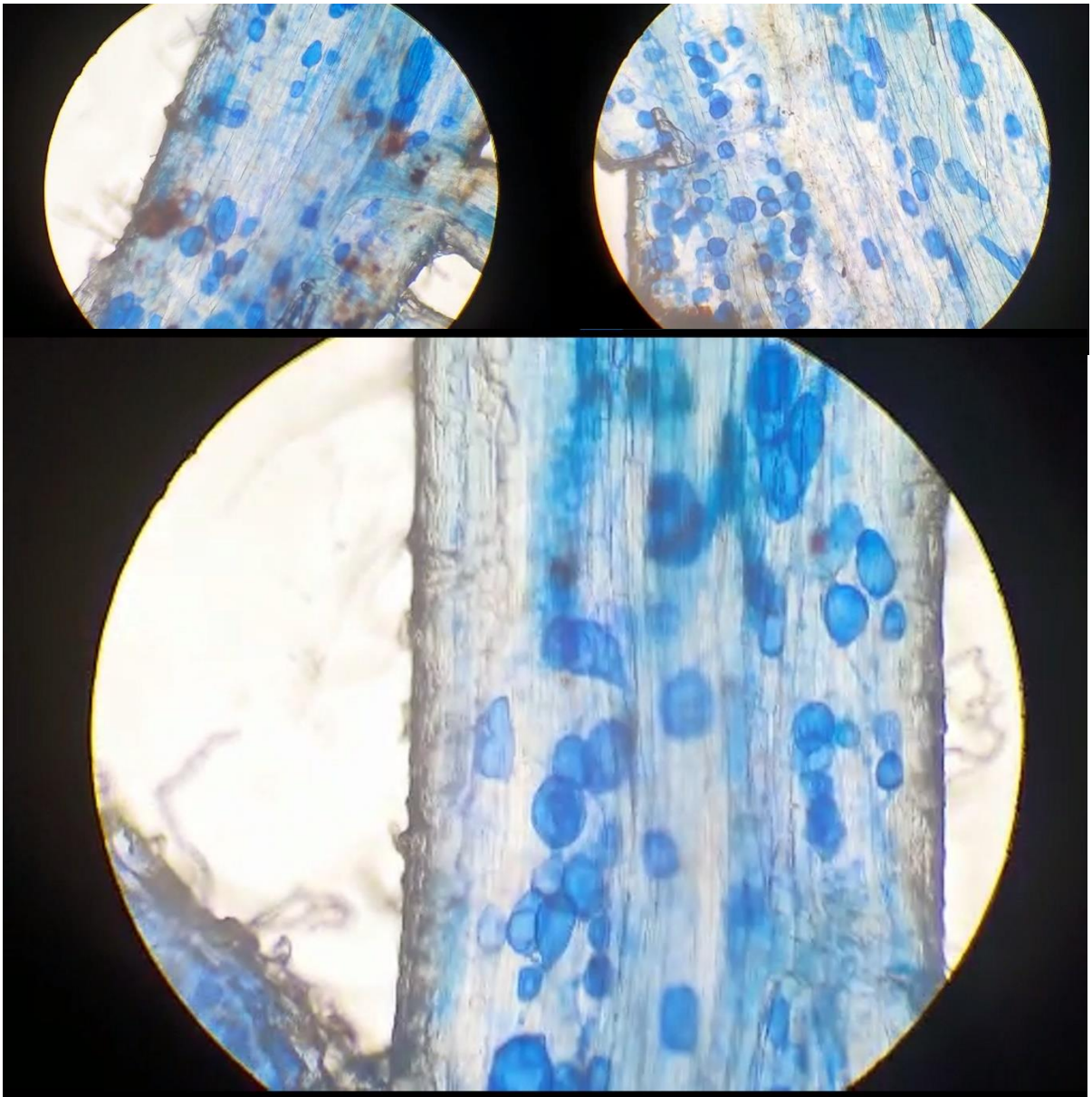
Fonte: Aatoria propria.

Tabela Suplementar 7. Resultados do teste de similaridade de Jaccard com base nas arestas das redes de co-ocorrência.

	UR	UP	UM	UI	Control
UR	0	0.9397136	0.9062882	0.9226594	0.919964
UP	0.9397136	0	0.8983051	0.9189189	0.9369085
UM	0.9062882	0.8983051	0	0.9082272	0.9200829
UI	0.9226594	0.9189189	0.9082272	0	0.9239661
Control	0.919964	0.9369085	0.9200829	0.9239661	0

Fonte: Aatoria propria

Imagem Suplementar 01. Estruturas de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) no interior de raízes de Urochloa.



Na imagem é possível observar vesículas, arbúsculos, hifas e esporos de FMAs. A fotos foram tiradas através de microscópio com aumento de 40x. Fonte: Autoria própria.