

ANÁLISE INTEGRADA DA DIVERSIDADE E INTERAÇÕES GENÉTICAS EM
ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM*

RITA DE KÁSSIA GUARNIER DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586

Silva, Rita de Kássia Guarnier da.

ANÁLISE INTEGRADA DA DIVERSIDADE E INTERAÇÕES GENÉTICAS EM ESTIRPES DE
BRADYRHIZOBIUM / Rita de Kássia Guarnier da Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

91 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2025.

Orientador: Geraldo de Amaral Gravina.

1. fixação biológica de nitrogênio, . 2. simbiovar, . 3. nova espécie, . 4. transferência
horizontal de genes, . 5. bioinformática. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ANÁLISE INTEGRADA DA DIVERSIDADE E INTERAÇÕES GENÉTICAS EM
ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM*

RITA DE KÁSSIA GUARNIER DA SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção de
título de Doutora em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Prof. Geraldo de Amaral Gravina
Coorientador: Prof. Jerri Edson Zilli

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO-2025

ANÁLISE INTEGRADA DA DIVERSIDADE E INTERAÇÕES GENÉTICAS EM
ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM*

RITA DE KÁSSIA GUARNIER DA SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção de
título de Doutora em Produção Vegetal”

Aprovada em 27 de fevereiro de 2025

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALBERTO FERNANDES DE OLIVEIRA JUNIOR**
Data: 26/11/2025 14:10:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alberto Fernandes de Oliveira Junior (Ph.D., Bioinformática) – Embrapa

Documento assinado digitalmente
 **DERIVALDO PUREZA DA CRUZ**
Data: 26/11/2025 15:30:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Derivaldo Pureza da Cruz (Ph.D., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

Documento assinado digitalmente
 **LÍLIA MARQUES GRAVINA**
Data: 27/11/2025 20:39:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lília Marques Gravina (Ph.D., Produção Vegetal) – UENF

Documento assinado digitalmente
 **GERALDO DE AMARAL GRAVINA**
Data: 27/11/2025 20:16:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Geraldo de Amaral Gravina (Ph.D., Fitotecnia) – UENF
Orientador

Documento assinado digitalmente
 **JERRI EDSON ZILLI**
Data: 27/11/2025 07:28:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jerri Édson Zili (Ph.D., Ciências do Solo) – Embrapa - Coorientador

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao universo, pelas oportunidades, pela força e por me guiarem durante estes quatro anos, mostrando que nunca estive sozinha.

Aos meus pais, Neusa Maria Guarnier e Anésio Ângelo da Silva, e aos meus irmãos, Kátia Helena e Fernando César, por todo o suporte familiar. Ao Stener Romanel Ambrozio, pelo apoio constante e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus orientadores Geraldo de Amaral Gravina e Jerri Édson Zilli, à Cláudia Pozzi Jantália, pela parceria, pela confiança depositada em mim e por todo o conhecimento compartilhado. À banca examinadora, pelas valiosas contribuições à minha formação acadêmica e profissional.

Aos profissionais da Embrapa Agrobiologia pelo auxílio técnico, e aos amigos de laboratório — em especial Peter, Jaqueline, Isabelly e Derivaldo —, pela companhia e por não me deixarem desanimar nos momentos difíceis.

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, destacando a dedicação da Prof.^a Dra. Daniela Barros, pelo suporte e oportunidades.

Agradeo em especial a Lilía Marques Gravina pelo apoio e paciência ao decorrer dessa jornada.

À Embrapa Agrobiologia, pela infraestrutura concedida, e à FAPERJ, pelo suporte financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Soja <i>Glycine max</i> (L.) Merrill].....	14
3.2 Nitrogênio.....	16
3.3 Uso da FBN na cultura da soja no Brasil.....	17
3.4 4 Cenário da soja na Austrália.....	19
3.5 Rizóbios e nodulação.....	20
3.6 Rizóbios do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	21
3.7 Taxonomia de bactérias.....	23
3.8 Transferência horizontal de genes.....	26
3.9 Métodos de identificação de THG.....	30
3.10 Incongruências e redes filogenéticas.....	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA MOBILIDADE SIMBIÓTICA E TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES EM RIZÓBIO DE SOJA DE ESTIRPES BRASILEIRAS E AUSTRALIANAS.....	
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4. CONCLUSÕES	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E PARÂMETROS GENÉTICOS EM CEPAS DE RIZÓBIOS NODULADORES DE SOJA.....	
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1. INTRODUÇÃO	90

2. MATERIAL E MÉTODOS	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4. CONCLUSÕES	101
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos cinco principais mecanismos de THG em procariotos: [a] conjugação; [b] nanotubos (Dubey e Ben-Yehuda, 2011); [c] transdução; [d] GTAs; [e] transformação. Adaptado de Soucy et al. (2015), Rangel (2017), página 28.

Figura 2: Exemplo de análise de perfil composicional do genoma de *Bradyrhizobium* sp. S23321 em representação circular do cromossomo. Adaptado de Okubo et al. (2012), página 31.

Figura 3: (A) Relação esperada entre distâncias gênicas e genômicas quando o gene evolui exclusivamente por herança vertical, resultando em congruência entre a árvore gênica e a genômica. (B) Incongruência observada nas distâncias entre pares quando ocorre transferência horizontal de genes, exemplificada pelo evento dirigido de um ancestral de X para um ancestral de B e C. Adaptado de Novichkov et al. (2004), página 32.

Figura 4: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene 16S rRNA das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR14866, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo, página 62.

Figura 5: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene *nodA* das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR14866, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo, página 65.

Figura 6: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene *nodB* das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo, página 67.

Figura 7: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene *nodC* das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo, página 69.

Figura 8: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas de diferentes cepas com base no gene *nodD* para as cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM

4799 e WSM4804 e espécies-tipo página 71

Figura 9: Árvore filogenética representando as relações evolutivas de construída a partir da concatenação dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nodD* para as cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo, página 73.

Figura 10: Árvore genômica construída a partir das cepas de *Bradyrhizobium* sp. BR 85, BR 86, BR 3287, BR 14863, BR 14864, BR 14865, BR 14866, BR 96, BR 29, BR 13973, CB1809, WSM4799, WSM4804 e espécies-tipo, página 75.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estirpes isoladas dos campos experimentais da Embrapa Agrobiologia e da *Murdoch University* utilizadas no estudo, página 52.

Tabela 2 – Modelo evolutivo de acordo com a substituição nucleotídica e seus critérios estatísticos, com ajustes de máxima verossimilhança com 24 modelos diferentes de substituição nucleotídica, página 61.

Tabela 3 - Identificação e classificação de espécies-tipo de rizóbios realizada com base nos resultados do *Genome Server* (TYGS), página 79.

Tabela 4 – Estirpes isoladas dos campos experimentais da Embrapa Agrobiologia e da *Murdoch University* utilizadas no estudo, página 92.

Tabela 5 – Quadrados médios obtidos no teste nodulação e matéria seca de plantas de soja em experimento de eficiência simbiótica inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* das variáveis: número de nódulos (NN), altura de plantas (ALTP) e massa seca da parte aérea (MSPA), página 95.

Tabela 6 – Teste de comparação de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade para as variáveis: número de nódulos por planta (NN), altura de plantas (ALTP) e massa seca de plantas (MSP) de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* em experimento de eficiência simbiótica, página 97.

Tabela 7 – Parâmetros genéticos de genótipos de soja para as variáveis massa seca da parte aérea (MSPA), altura de planta (ALTP) e número de nódulos por planta (NN) de experimento conduzido sob condições controladas na *Murdoch University*, Perth/WA- Austrália no ano de 2023, página 99.

RESUMO

DA SILVA, Rita de Kássia Guarnier; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro 2025; ANÁLISE INTEGRADA DA DIVERSIDADE E INTERAÇÕES GENÉTICAS EM ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM*. Orientador: D.Sc. Geraldo de Amaral Gravina; Coorientador: D.Sc. Jerri Édson Zili.

O presente estudo visa explorar a complexidade genética e as relações evolutivas entre diferentes estirpes de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp., conhecidas por sua capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com plantas leguminosas. A pesquisa combina métodos de análise genômica, filogenética e de bioinformática para identificar a diversidade genética e os padrões de interação entre os genes nas estirpes de *Bradyrhizobium*. Essa análise integrada permite uma compreensão aprofundada das adaptações evolutivas e das interações gênicas que contribuem para a eficácia simbiótica dessas bactérias, com implicações potenciais para a agricultura sustentável e o melhoramento de culturas leguminosas. Dois estudos foram conduzidos neste trabalho: i) avaliação da mobilidade simbiótica e transferência horizontal de genes em rizóbios de soja de estirpes brasileiras e australianas e ii) avaliação da eficiência simbiótica e parâmetros genéticos em cepas de rizóbios noduladores de soja. Os resultados obtidos no primeiro estudo revelaram uma elevada diversidade genética entre as estirpes, demonstrando que estas não formam um grupo monofilético único. Confirmou-se também o papel fundamental da transferência horizontal de genes (THG) na evolução destas bactérias, como evidenciado pela estirpe BR 86, que partilha os mesmos genes de simbiose da BR 85, apesar de possuir um fundo cromossômico distinto. No segundo estudo, o experimento demonstrou que as diferentes estirpes exerceram um efeito altamente significativo no desempenho das plantas, com variações marcantes no número de nódulos (NN), altura das plantas (ALTP) e produção de massa seca da parte aérea (MSPA). A avaliação dos parâmetros genéticos indicou altas taxas de herdabilidade para a altura e o número de nódulos, evidenciando que a variabilidade genética supera as variações ambientais, o que configura um cenário altamente favorável para a

seleção genética.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, transferência horizontal de genes, bioinformática.

ABSTRACT

DA SILVA, Rita de Kássia Guarnier; D.Sc.; State University of the North Fluminense Darcy Ribeiro; february 2025; INTEGRATED ANALYSIS OF DIVERSITY AND GENETIC INTERACTIONS IN *BRADYRHIZOBIUM* STRAINS; Advisor: D.Sc. Geraldo de Amaral Gravina; Co-advisor: D.Sc. Jerri Édson Zili.

The present study aims to explore the genetic complexity and evolutionary relationships among different strains of bacteria of the genus *Bradyrhizobium* sp., known for their ability to fix nitrogen in symbiosis with leguminous plants. The research combines genomic, phylogenetic, and bioinformatic analysis methods to identify the genetic diversity and gene interaction patterns in *Bradyrhizobium* strains. This integrated analysis allows for an in-depth understanding of the evolutionary adaptations and gene interactions that contribute to the symbiotic efficacy of these bacteria, with potential implications for sustainable agriculture and the improvement of leguminous crops. Two studies were conducted in this work: i) evaluation of symbiotic mobility and horizontal gene transfer in soybean rhizobia from Brazilian and Australian strains, and ii) evaluation of symbiotic efficiency and genetic parameters in soybean-nodulating rhizobia strains. The results obtained in the first study revealed high genetic diversity among the strains, demonstrating that they do not form a single monophyletic group. The fundamental role of horizontal gene transfer (HGT) in the evolution of these bacteria was also confirmed, as evidenced by strain BR 86, which shares the same symbiosis genes as BR 85, despite having a distinct chromosomal background. In the second study, the experiment demonstrated that the different strains exerted a highly significant effect on plant performance, with marked variations in nodule number (NN), plant height (PH), and shoot dry mass (SDM). The evaluation of genetic parameters indicated high heritability rates for plant height and nodule number, evidencing that genetic variability surpasses environmental variations, which establishes a highly favorable scenario for genetic selection.

Keywords: biological nitrogen fixation, symbiovar, new species, horizontal gene transfer, bioinformatics.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* desempenham um papel crucial na agricultura devido à sua capacidade de fixar nitrogênio gasoso (N₂) em amônia (NH₃) pela quebra da ligação tripla por meio da ação da enzima dinitrogenase (Hungria et al., 2013). Essas bactérias são caracterizadas pelo agrupamento de rizóbios que apresentam lento crescimento, com capacidade de tornar alcalino o meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono (Graham, 1976). Os solos brasileiros são originalmente desprovidos de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, consideradas como as mais eficientes na nodulação da soja (Hungria e Kaschuk, 2014).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm investigado a diversidade genética e as interações entre estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizando uma variedade de abordagens como análises genômicas, filogenéticas e bioinformáticas (Klepa et al., 2021). Pesquisas genômicas têm revelado uma vasta diversidade genética dentro do gênero, indicando a existência de múltiplas linhagens adaptadas a diferentes *Bradyrhizobium* sp. (Takeuchi et al., 2024). No entanto, ainda existem lacunas significativas no conhecimento, particularmente no que diz respeito à compreensão detalhada das interações gênicas que determinam a eficácia simbiótica e à identificação de marcadores genéticos específicos que possam ser utilizados para melhorar a eficiência da fixação de nitrogênio.

Dois estudos foram conduzidos neste trabalho. (i) avaliação da mobilidade simbiótica e transferência horizontal de genes em rizóbios de soja de estirpes brasileiras e australianas e ii) avaliação da eficiência simbiótica e parâmetros genéticos em cepas de rizóbios noduladores de soja. Este trabalho teve como finalidade investigar a diversidade genética e a mobilidade de genes simbióticos em estirpes de *Bradyrhizobium*, bem como avaliar a eficiência simbiótica dessas bactérias, contribuindo para a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na fixação biológica de nitrogênio e para o desenvolvimento de estratégias que favoreçam a sustentabilidade e a produtividade da cultura da soja.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar, de forma integrada, a diversidade genética, as relações evolutivas e a eficiência simbiótica de diferentes estirpes de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, visando compreender os mecanismos genéticos envolvidos na fixação biológica de nitrogênio e o seu impacto no desenvolvimento e na produtividade da cultura da soja (*Glycine max*).

2.2. Objetivos Específicos:

- **Caracterizar a diversidade genética e filogenética:** Através dos métodos de sequenciamento genômico e ferramentas de bioinformática para identificar as relações evolutivas entre 13 estirpes de rizóbios noduladores de soja isoladas em áreas produtivas do Brasil e da Austrália;
- **Investigar a transferência horizontal de genes (THG):** Avaliar a mobilidade simbiótica e identificar a ocorrência e o impacto de eventos de transferência horizontal de genes (genes nod e nif) na evolução e na adaptação das estirpes de *Bradyrhizobium*;
- **Avaliar a eficiência simbiótica:** Determinar o efeito da inoculação de diferentes estirpes no desempenho agrônomo das plantas de soja, analisando variáveis como o número de nódulos (NN), a altura das plantas (ALTP) e a produção de massa seca da parte aérea (MSPA);
- **Estimar parâmetros genéticos:** Calcular as taxas de herdabilidade e outros parâmetros genéticos associados ao desempenho das plantas inoculadas, com o intuito de identificar os genótipos de *Bradyrhizobium* com maior potencial para a seleção genética e o aprimoramento de inoculantes agrícolas sustentáveis.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Soja *Glycine max* (L.) Merrill

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta herbácea, pertencente à classe Magnoliopsida (Eudicotiledônea), ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* L., espécie *max* e tem como possível progenitor a espécie *Glycine ussuriensis* (Müller, 1981). É uma planta com grande variabilidade genética, com desempenho produtivo influenciado pelas variações do ambiente de cultivo (Alambert, 2010). Segundo Batista (2022) existe uma grande variação de ciclo entre os cultivares de soja. Em tese, no Brasil os ciclos variam entre 100 e 160 dias, e podem ser classificados em grupos de maturação precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, dependendo da região. A altura da planta está subordinada às condições ambientais e ao genótipo.

As principais cultivares do mercado apresentam caule híspido, com poucas ramificações e raiz com eixo principal e muitas ramificações. Possuem folhas trifolioladas, com exceção do primeiro par de folhas simples, no nó acima do nó cotiledonar. Apresentam flores de fecundação autógama, típicas da subfamília Papilionoideae, de cor branca, roxa ou intermediária. Desenvolvem vagens levemente curvadas que, à medida que amadurecem, evoluem da cor verde para amarelo-pálido, marrom-claro, marrom ou cinza, e que podem conter de uma a cinco sementes lisas, elípticas ou globosas, de tegumento amarelo pálido, com hilo preto, marrom ou amarelo-palha (Nepomuceno et al., 2012).

A soja é uma cultura cujo centro de origem se atribui ao continente asiático, mais precisamente, à região correspondente à China Antiga (Faxe et al., 2017). Existem referências bibliográficas que comprovam que a leguminosa é uma das culturas mais antigas, cultivada como base alimentar pelos povos asiáticos há mais de cinco mil anos. A sua dispersão pelo mundo ocorreu graças aos mercadores ingleses e aos imigrantes japoneses e chineses (Missão, 2008).

No Brasil, o primeiro registro do cultivo de soja existente é de Gustavo D'Utra no ano de 1882, no estado da Bahia, através de sementes trazidas dos Estados Unidos (Black, 2000). Posteriormente, foi introduzida no estado de São

Paulo para estudos na Estação Agronômica de Campinas por Daffert em 1892. Em 1914 foi introduzida no Rio Grande do Sul (Freitas, 2011). Entretanto, foi apenas em 1970 que essa leguminosa alcançou um grande destaque comercial e passou a ser amplamente estabelecida em território nacional, devido a uma crise agrícola na safra da Rússia e a insuficiência da produção americana em suprir a demanda mundial. Nesta época, o Brasil ultrapassou a China, e se tornou o segundo maior produtor mundial de soja, perdendo apenas para os Estados Unidos (Gazzoni e Dall'agnol, 2018).

Entre os anos 2000 e 2019, o Brasil foi o segundo maior produtor de soja, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América. A partir de 2020, o país alcançou o primeiro lugar com 126 milhões de toneladas produzidas e 84 milhões de toneladas exportadas. Atualmente, o Brasil responde por 50% do comércio mundial de soja, e as exportações brasileiras do grão somaram 30 bilhões de dólares em 2024 (FAOSTAT, 2024).

A produção brasileira de grãos, no sétimo levantamento de grãos 2023/2024 da CONAB, foi estimada em 294,1 milhões de toneladas, o que representa uma redução de 8% em relação à obtida na temporada passada, ou seja, 25,7 milhões de toneladas a menos a serem colhidas. Com uma área estável, estimada em 78,53 milhões de hectares, a quebra se deve, sobretudo, à atuação de forte intensidade do fenômeno El Niño, que em 2023 teve influência negativa desde o início do plantio até as fases de desenvolvimento das lavouras nas regiões produtoras do país. Isso impacta a produtividade média, que saiu de 4.072 quilos por hectare para 3.744 kg/ha.

O cultivo da soja ocupa uma parcela significativa das áreas agrícolas em estados brasileiros como Paraná e Mato Grosso (EMBRAPA, 2018). Os estados com a maior produção de grãos em toneladas foram Mato Grosso (29.778,544 t), Rio Grande do Sul (17.311,971 t) e Paraná (15.252,347 t), respectivamente. A maior parte da produção nacional destina-se à comercialização na forma de grão seco e tem como principal destino a fabricação de ração animal e óleo vegetal. Além dos usos da *commodity*, a soja também pode ser utilizada diretamente como hortaliça (edamame), seja como grãos verdes colhidos antes da fase de maturação (De Mendonça e Carrão-Panizzi, 2003) ou como brotos (Carrão-Panizzi e Hinson, 1989).

3.2 Nitrogênio

O nitrogênio (N) é essencial para todos os processos biológicos das plantas, sendo considerado o nutriente mais limitante para os vegetais que crescem em seu ambiente natural (Gross et al., 2017). Sendo o quarto nutriente mais abundante nas plantas, depois do carbono (C), oxigênio (O) e hidrogênio (H) (Taiz et al., 2017). Embora a atmosfera seja composta por cerca de 78% de nitrogênio gasoso (N_2), a maioria dos organismos não consegue utilizá-lo como nutriente devido à tripla ligação entre os dois átomos de N, considerada uma das mais estáveis encontradas na natureza. No entanto, o nitrogênio gasoso pode penetrar através das camadas porosas do solo e ser utilizado por microrganismos, principalmente bactérias diazotróficas que são capazes de fixar nitrogênio gasoso (N_2) em amônia (NH_3) pela quebra da ligação tripla por meio da ação da enzima nitrogenase (Hungria et al., 2013).

Embora os organismos vivos necessitem desse elemento em abundância, ele é encontrado na natureza em uma forma quimicamente muito estável, e sua disponibilidade para absorção pela maioria dos organismos é limitada, pois é necessário convertê-lo a uma forma assimilável (Chaves et al., 2018). Na natureza, além da sua forma molecular (N_2) o nitrogênio pode ser encontrado como íons de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O), amônia (NH_3), amônio (NH_4^+) e dióxido de nitrogênio (NO_2) e também associado em compostos orgânicos nitrogenados (Kishorekumar et al., 2020). Em sua grande maioria, as plantas adquirem o nitrogênio do solo na forma de NO_3^- , em alguns casos, podem absorver sob a forma de íon amônio (NH_4^+) (Bredemeier e Mundstock, 2000).

No solo, a principal fonte de nitrogênio assimilável para as plantas é proveniente da decomposição da matéria orgânica. No entanto, essa produção é limitada, podendo ser facilmente esgotada em períodos curtos de cultivo. O uso de fertilizantes nitrogenados é considerado a forma mais rápida de assimilação pelas plantas, entretanto, na maioria das vezes é inviável economicamente, além de causar danos elevados ao meio ambiente (Hungria et al., 2007; Chen et al., 2021).

Uma condição desfavorável em relação ao uso dos fertilizantes nitrogenados consiste em uma baixa eficiência de sua utilização pelas culturas

a campo, pois dificilmente ultrapassam os 50% de absorção (Helene et al., 2014). Um fato que deve ser levado em consideração é a facilidade de lixiviação desse nutriente e o seu escoamento pela superfície do solo, que resultam em uma alta concentração de formas nitrogenadas nas bacias hidrográficas, podendo ser tóxicas para diversos organismos desses ecossistemas, inclusive para o homem (Caovilla et al., 2005; Hungria et al., 2007). Outro agravante que pode ocorrer é a desnitrificação do nitrato por bactérias específicas do solo, que apresentam como consequência a liberação de N_2O , um dos gases causadores do efeito estufa (Hungria e Mendes, 2015; Zopas et al., 2016).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada, depois da fotossíntese, o processo biológico mais importante do planeta, pois fornece em torno de 70% de todo o nitrogênio requerido na natureza (Hungria et al., 2020). Esse processo é executado por diversas espécies de bactérias que habitam o solo, que recebem várias denominações, como por exemplo organismos fixadores de nitrogênio, diazotróficos ou rizóbios (Hungria e Mendes, 2015).

3.3 Uso da FBN na cultura da soja no Brasil

A soja é uma das principais culturas agrícolas no Brasil, em grande parte devido a uma estratégia de inoculação bem organizada, com cepas inoculantes altamente eficientes. Quatro cepas de *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080) são utilizadas atualmente como inoculantes e são recomendadas para o cultivo da soja brasileira desde 1992. No Brasil, o uso de estirpes das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* representam um progresso agrícola para a cultura da soja, garantindo uma alta produtividade a baixo custo de produção, devido à FBN (Hungria e Mendes, 2015; Ormeño-Orrillo, 2019).

O progresso da produção e a ampliação da capacidade competitiva da soja brasileira, estão intimamente ligados aos avanços científicos e tecnológicos na esfera produtiva. Entre estas tecnologias, destaca-se o desenvolvimento de inoculantes com estirpes de bactérias diazotróficas, selecionadas por meio de pesquisas científicas que demonstraram quais grupos apresentavam elevada eficiência simbiótica, resultando assim na independência da cultura em relação aos fertilizantes nitrogenados.

O nutriente mais requerido na cultura da soja é o nitrogênio (N). Estima-

se que 25 a 35% do N seja fornecido pelo solo e 65% a 85% do N₂ atmosférico seja absorvido pela fixação simbiótica das bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Estima-se que para produzir 1000 kg de grãos são necessários cerca de 80 kg de N (Zilli et al., 2005; Hungria et al., 2007; Braccini et al., 2016). A inoculação das sementes na cultura da soja, através do uso dos rizóbios, fornece praticamente todo o nitrogênio requerido pela planta durante seu ciclo de cultivo (Hungria e Kaschuk, 2014).

O uso da inoculação com rizóbios na soja é uma técnica, sobretudo, aplicada à produção de grãos que atendem tanto ao consumo humano quanto ao consumo animal (Urano et al., 2006; Zilli et al., 2006; Hungria et al., 2007; Zilli et al., 2010). Consequentemente, estudos exploratórios da interação entre as leguminosas e seus parceiros simbióticos assumem um papel fundamental para a maximização dos benefícios desta biotecnologia, principalmente para a cultura da soja, que tem grande impacto no PIB brasileiro.

Os fatores que influenciam a eficiência da FBN ocorrem através dos genótipos inerentes aos simbioss e da interação genótipo x ambiente (Moreira e Siqueira, 2006; Chaves et al., 2018). Em condições de clima tropical, como no caso do Brasil e da Austrália, os principais fatores abióticos que podem afetar o potencial da FBN são: temperatura, acidez, toxidez de alumínio, salinidade e baixa fertilidade do solo (Dias dos Santos et al., 2021). Estima-se ser necessário 80 kg de N para se produzir 1.000 kg de grãos de soja (Hungria, 2001; Zilli et al., 2006).

A FBN, através da simbiose rizóbio/leguminosa, é uma forma barata e eficiente de suprir as necessidades de cultivo. Para a soja, por exemplo, a inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. supre as necessidades da planta, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. A utilização da FBN na cultura da soja elimina a necessidade de fertilizantes nitrogenados, resultando em uma redução nas importações desses produtos. Segundo Telles et al. (2023), a economia gerada pela substituição de ureia por fixação biológica de nitrogênio (FBN) na safra 2019-2020 foi estimada em 15,2 bilhões de dólares. Nessa mesma safra, o lucro advindo da inoculação e coinoculação chegou a 914 milhões de dólares. A tecnologia de coinoculação de soja com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* foi aplicada em 25% de toda a área de soja cultivada no Brasil em 2019-2020. Além disso, a substituição de fertilizantes

nitrogenados pela FBN mitigou 183 milhões de toneladas de CO₂- e, valor equivalente a mais de 5 bilhões de dólares em créditos de carbono.

3.4 Cenário da soja na Austrália

A produção de soja na Austrália é relativamente pequena, quando comparada com grandes potências agrícolas como Brasil, Estados Unidos e Argentina. No entanto, a produção aumentou nos últimos anos devido à crescente demanda por produtos de soja para consumo alimentar e biocombustíveis. A produção australiana está concentrada nos estados de Queensland e New South Wales, e a soja australiana é valorizada tanto no mercado interno quanto no externo, especialmente por sua qualidade e, em grande parte, por ser não transgênica. As condições climáticas dessas regiões, aliadas aos solos adequados, tornam essas áreas propícias para o cultivo, embora a produção seja altamente dependente das chuvas sazonais.

Segundo Bullard et al. (2005), em 1879, a soja chegou pela primeira vez à Austrália, como um presente do Ministro do Interior do Japão. Em maio de 1879, sementes de soja estavam disponíveis para distribuição aos agricultores (existem registros publicados no *Jornal Brisbane Courier*, Queensland, 1879). Há registros de que, a partir de 1891, a soja foi cultivada pela primeira vez na Austrália, e todos os primeiros experimentos foram descritos no *Agricultural Gazette of New South Wales*. Em 1914, ocorreu a distribuição governamental de inoculantes, porém havia muitos relatos de que não eram eficientes.

Segundo a PS&D a produção australiana para a safra 2023/2024 possui uma área plantada de apenas 25 mil hectares, com produção de 43 mil toneladas, com produtividade por área de 1.700 kg/ha. Atualmente, a Austrália ocupa a quadragésima posição no ranking mundial de produção de soja. O Brasil produz 3,6 vezes mais soja, com uma área plantada 1,75 vezes maior que a da Austrália. A produtividade da soja brasileira é 2,08 vezes maior que a da soja australiana.

A Austrália usa cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (CB1809) como inoculante comercial para soja desde 1960, e o *Australian Inoculants Research Group* estima que o uso passado e presente de inoculantes economiza aos agricultores australianos cerca de US\$ 4 bilhões por ano. A quantidade total de

nitrogênio fixada pelos vegetais agrícolas é estimada em 2,7 milhões de toneladas anualmente. Diferente do Brasil, os australianos não utilizam a coinoculação de *Bradyrhizobium* com *Azospirillum* sp., pois as condições ambientais na Austrália, como a variabilidade climática e a composição do solo, podem influenciar a eficácia da coinoculação.

3.5 Rizóbios e nodulação

O termo rizóbio é atribuído às bactérias gram-negativas que vivem no solo e fixam nitrogênio, com capacidade de induzir a nodulação em leguminosas. Essa relação simbiótica é uma das principais rotas pelas quais o nitrogênio entra nos sistemas naturais, contribuindo com cerca de 12 a 200 milhões de toneladas de nitrogênio anualmente. (Vieira, 2017; Hara e Oliveira, 2019), sendo que 25 a 90 milhões provêm da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em sistemas naturais (Dias, 2020; De Freitas et al., 2021; Hungria et al., 2001).

Os rizóbios pertencem às subclasses α e β -Proteobactérias, são aeróbias obrigatórias, não formam endósporos, apresentam capacidade de promoção da formação de estruturas hipertróficas corticais em raízes, e, notavelmente, no caule, essas estruturas são designadas de nódulos (Chaves et al., 2018). Podem ser considerado um processo de relação simbiótica de protocooperação ou mutualismo (Dionísio et al., 2016), no qual os rizóbios fornecem N por meio da nitrogenase. Esse complexo de atividade enzimática é capaz de quebrar a ligação tripla existente entre as moléculas do N_2 , transformando-o em uma molécula mais reativa, que possibilita a transformação para a forma assimilável pelas plantas (NH_3). Em contrapartida, as plantas transferem os açúcares sintetizados no processo de fotossíntese até as raízes, fazendo com que as bactérias que residem no interior dos nódulos sejam beneficiadas, tendo assim condições favoráveis para sobreviverem (Sankhla et al., 2017).

A síntese dos genes de nodulação e os fatores de nodulação (fatores Nod) pelo diazotróficos são oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs) que induzem modificações radiculares no estágio de pré-infecção, essenciais à infecção do rizóbio para a formação do nódulo e posterior fixação do nitrogênio (N_2). O gene *nodC* é responsável pela biossíntese da estrutura básica do fator Nod, mais especificamente, é responsável pelo controle da etapa de alongação da cadeia

principal do oligossacarídeo. O gene *nifH*, em conjunto com outros genes, codifica a formação da proteína FeMo, responsável pelo processo de FBN (Dolgikh et al., 2019).

Os bacterioides povoam de forma direta o córtex da raiz subepidérmica, realizando assim a etapa de aderência às raízes. No córtex da raiz, provocam a morte celular local formando bolsas de infecção intercelular, que são ocupadas pelos rizóbios. O povoamento e indução da morte celular são controladas por espécies reativas de oxigênio e etileno (Glyan'ko, 2018). Portanto, as bactérias contidas nas bolsas de infecção chegam às entranhas dos tecidos vegetais por meio do colapso das células (Guinel, 2015).

A porcentagem exata da diversidade total dos rizóbios conhecida atualmente é difícil de determinar com precisão, mas estima-se que apenas uma fração dessa diversidade foi documentada. Considera-se que menos de 50% da diversidade total dos rizóbios é conhecida, sendo que boa parte desses rizóbios conhecidos predomina nas florestas tropicais (Delamuta, 2020). Perante o exposto, centros de pesquisa de todas as partes do mundo vêm trabalhando com pesquisas científicas para descobrir a diversidade desses microrganismos e seus benefícios à produção agrícola, bem como sua atuação nos sistemas naturais.

3.6 Rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*

A primeira ocorrência documentada do isolamento de bactérias a partir de nódulos de raízes de plantas da família Fabaceae ocorreu no final do século XIX. Posteriormente, foi confirmado que esses microrganismos eram responsáveis por fixar nitrogênio atmosférico em plantas hospedeiras. A princípio, essas bactérias foram denominadas de *Bacillus radicola* (Beijerinck, 1888), e mais tarde reclassificadas para o gênero *Rhizobium*, sendo todas representadas por apenas uma espécie, *R. leguminosarum* (Frank, 1889).

O gênero *Bradyrhizobium* é caracterizado pelo agrupamento de rizóbios que apresentam lento crescimento, com capacidade de tornar alcalino o meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono (Graham, 1976). Em 1982, Jordan observou esses atributos fisiológico-culturais para a espécie "*Rhizobium japonicum*", que posteriormente foi reclassificada, resultando assim no gênero

Bradyrhizobium. Esse gênero estabelece simbiose com diversas plantas hospedeiras herbáceas ou arbóreas, podendo ser encontrado em diferentes regiões do mundo com os mais variados climas (Sperb, 2018). Segundo Avontuur (2019), a primeira espécie descrita de forma válida foi *B. japonicum* no início da década de 80, e, aproximadamente dez anos depois, foram descritos *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium liaoningense*.

Desde então, o número de descrições de novas espécies de *Bradyrhizobium* aumentou drasticamente. Atualmente, estima-se que existam cerca de 95 espécies do gênero *Bradyrhizobium* descritas oficialmente e publicadas com validade (Ormeño-Orrillo, 2019). A tendência é que este número de espécies aumente de acordo com a aplicação de novas técnicas baseadas no uso de marcadores moleculares e fenotípicos, que estão sendo elaborados e aperfeiçoados para aumentar a capacidade de distinção entre esses microrganismos. Nesse sentido, marcadores como *recA*, *glnII*, *atpD*, *dnaK*, *gyrB* e *rpoB* têm sido amplamente usados para caracterizar espécies e linhagens de *Bradyrhizobium* sp. (Vinuesa et al., 2005b; Rivas et al., 2009; Delamuta et al., 2012). Novos marcadores como o gene *ftsA* fornecem filogenias consistentes àquelas derivadas das sequências dos genes *recA* e *glnII* (Kalita e Malek, 2019; Ormeño-Orrillo, 2019).

O genoma de *Bradyrhizobium* varia entre as espécies, sendo caracterizado, em geral, por seu grande tamanho (variando de 6 a 9 Mb) e pela presença de poucos plasmídeos, sem a ocorrência de plasmídeos de simbiose (Okazaki et al., 2015). Em seus cromossomos, encontram-se ilhas de simbiose que abrigam os genes *nod* e *nif*, responsáveis pela nodulação e pela fixação biológica de nitrogênio, respectivamente.

Os marcadores moleculares comumente utilizados para reconstruções filogenéticas dessa simbiose são os genes *nifH* e os genes *nod* (especificamente *nodA* e *nodC*). Em relação a estes últimos, observa-se uma grande diversidade nucleotídica (Stepkowski et al., 2007; Martínez-Romero et al., 2010). As análises filogenéticas suportam a hipótese de que a evolução desses genes em bradirrízobios ocorre tanto por transferência vertical quanto horizontal (Moulin et al., 2004; Menna e Hungria, 2011).

Adicionalmente, simbióvares definidos pela especificidade com o hospedeiro, foram identificados para algumas espécies de *Bradyrhizobium*

(Rogel et al., 2011), e novos simbiovares têm sido descritos recentemente (Bejarano et al., 2014; Cobo-Diaz et al., 2014; Ramirez-Bahena et al., 2016; Delamuta et al., 2017; Salmi et al., 2018; Martins da Costa et al., 2019). Esse gênero engloba espécies com uma variedade de adaptações no seu habitat. Tais bactérias podem instituir relações simbióticas ou endofíticas tanto com hospedeiros leguminosos quanto com não leguminosos e, em alguns casos, podem ser fotossintéticos (Jordan, 1982; Jones et al., 2016; Avontuur et al., 2019). Apesar da maior parte das espécies viver livremente no solo, algumas se destacam por se desenvolverem em ambientes clínicos.

Os *Bradyrhizobium* têm ampla distribuição geográfica, quando associados a leguminosas, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Além do mais, esses rizóbios são capazes de fixar nitrogênio em parceria com leguminosas de diferentes grupos filogenéticos, incluindo clados emergentes e tardios, das subfamílias Papilionoideae e Caesalpinioideae da família Fabaceae. As cepas de *Bradyrhizobium* desempenham um papel fundamental como simbiossiontes em diversas leguminosas que formam nódulos, sendo amplamente reconhecidas como simbiossiontes ancestrais desses vegetais.

Novas abordagens para a identificação de espécies têm se concentrado na análise genômica, incluindo a *Average Nucleotide Identity* (ANI), conforme descrito por Richter e Rossello-Mora (2009), e em métodos filogenômicos, como os propostos por Wu e Scott (2012), que têm se mostrado extremamente úteis para esse fim. Um estudo filogenômico das cepas de *Bradyrhizobium* revelou que a presença e o tipo de flagelo são determinados de forma filogenética (Garrido-Sanz et al., 2019). Pesquisas filogenômicas também foram conduzidas com beta-rizóbios (Beukes et al., 2017; Estrada-de Los Santos et al., 2018), revelando novos gêneros. O objetivo deste estudo foi aplicar uma abordagem semelhante, baseada em genômica, para fornecer uma análise atualizada e global do gênero *Bradyrhizobium*, com o intuito de apoiar seu status taxonômico. Estudo semelhante foi previamente realizado para os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Agrobacterium*, ajudando a esclarecer suas designações taxonômicas (Ormeño-Orrillo et al., 2015).

3.7 Taxonomia de bactérias

A taxonomia é a ciência responsável pela classificação dos organismos, organizando-os em grupos taxonômicos com base na nomenclatura e identificação, levando em consideração suas similaridades e diferenças (Vandamme et al., 1996). No campo da microbiologia, a classificação de bactérias sempre foi um desafio, uma vez que métodos baseados exclusivamente em características fenotípicas resultavam em grupos taxonômicos heterogêneos e pouco informativos (Busse et al., 1996). Com a evolução das técnicas de biologia molecular e genômica, novos critérios foram incorporados, permitindo uma classificação mais precisa e confiável.

Historicamente, a taxonomia bacteriana teve início no século XVIII com os estudos de Lineu, e foi posteriormente ampliada com as contribuições de Ferdinand Cohn, que, em 1872, classificou as bactérias com base em suas propriedades morfológicas. Inicialmente, a classificação microbiológica utilizava características morfológicas, exigências de crescimento e potencial patogênico como principais marcadores taxonômicos. Posteriormente, traços sorológicos e características fisiológicas foram incorporados para distinguir principalmente bactérias patogênicas (Schleifer e Stackebrandt, 1983). Durante a primeira metade do século XX, a introdução de análises bioquímicas contribuiu significativamente para a melhoria da classificação bacteriana, culminando no desenvolvimento da taxonomia numérica, que utilizava métodos estatísticos para fornecer medidas quantitativas de similaridade entre as bactérias, reduzindo a subjetividade das análises (Rossello-Mora e Amann, 2001; Schleifer, 2009; Sentausa e Fournier, 2013).

O grande avanço na taxonomia bacteriana ocorreu com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, especialmente com o sequenciamento do gene 16S rRNA, que permitiu a construção de uma árvore filogenética universal baseada em um marcador molecular confiável (Ludwig e Schleifer, 1994). Esse marco foi reforçado pelos estudos de Woese et al. (1990), que propuseram a divisão dos seres vivos em três domínios: Eubacteria, Archaea e Eukarya. A partir desse conhecimento, a classificação bacteriana passou a integrar diferentes níveis de informação para construir um sistema taxonômico mais robusto e multidimensional.

No contexto moderno, a taxonomia polifásica se consolidou como a abordagem mais adequada para a classificação bacteriana. Esse modelo integra

dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos para uma identificação mais precisa e abrangente das espécies (Vandamme et al., 1996; Rossello-Mora e Amann, 2001; Sentausa e Fournier, 2013). Além disso, o *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP) estabeleceu critérios mínimos para a descrição de novos gêneros e espécies de rizóbios e agrobactérias, exigindo a disponibilização de uma sequência de genoma da estirpe tipo e evidências de diferenciação baseadas em sequências genômicas (De Lajudie et al., 2019).

A caracterização fenotípica continua sendo uma etapa essencial na identificação bacteriana, abrangendo a morfologia das colônias, características fisiológicas e bioquímicas, além de suas aplicações biotecnológicas (Boone e Castenholz, 2001; Pontes et al., 2007). Entretanto, os métodos genotípicos têm ganhado destaque por sua maior precisão e confiabilidade, incluindo técnicas como a determinação da porcentagem de bases G+C, hibridização DNA-DNA, PCR e sequenciamento (Stackebrandt et al., 2002). Entre essas abordagens, a *Average Nucleotide Identity* (ANI) tem se mostrado uma ferramenta eficaz para comparar genomas, calculando a identidade média de nucleotídeos entre pares de genomas. Essa técnica surgiu como uma alternativa à hibridização DNA-DNA e tem sido aprimorada por diferentes algoritmos para otimizar o tempo de análise e expandir a comparação genômica (Palmer et al., 2020).

Apesar da importância do gene 16S rRNA como marcador filogenético, sua alta conservação pode limitar a diferenciação entre espécies muito relacionadas (Barrera et al., 1997; Stackebrandt et al., 2002). No caso dos rizóbios, há indícios de que genes ribossomais podem sofrer transferência lateral e recombinação genética, impactando diretamente a classificação taxonômica (Van Berkum et al., 2003). Dessa forma, novos marcadores moleculares foram propostos, especialmente genes housekeeping, que evoluem a uma taxa mais rápida que o 16S, mas ainda são suficientemente conservados para manter informações genéticas relevantes (Martens et al., 2007; Dall'Agnol et al., 2013).

No estudo do gênero *Bradyrhizobium*, genes como *recA*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB* e *atpD* têm sido amplamente utilizados para inferências filogenéticas (Ormeño-Orrillo et al., 2006; Vinuesa et al., 2005). O uso desses marcadores tem sido fundamental para aprimorar a classificação taxonômica dentro do grupo dos rizóbios, fornecendo uma base mais sólida para a distinção de espécies.

3.8 Transferência horizontal de genes

A transferência horizontal de genes (THG) é o processo pelo qual uma bactéria transfere ou adquire material genético de outra bactéria, sem que ocorra reprodução, sendo considerado um dos principais meios responsáveis pela evolução das bactérias, possuindo um papel fundamental para o desenvolvimento de quase todas as famílias gênicas existentes (Ochman et al., 2000; Gogarten et al., 2002). Trata-se de uma atividade biológica que ocorre entre os seres vivos de forma natural, e pode ocorrer por meio de vários pequenos segmentos de DNA de cerca de 300 pb, bem como por outros que transferem muitos genes de uma só vez. No entanto, o DNA pode ser transferido para espécies não relacionadas (Thomas e Nielsen, 2005; Soucy et al., 2015).

Embora a THG exista desde os primórdios de vida na Terra, o conceito de troca gênica entre os organismos surgiu apenas em 1928, por meio dos microbiologista Frederick Griffith e Waksman, ao identificar que determinantes de virulência poderiam ser transferidos entre *Streptococcus pneumoniae* patogênicas para linhagens não patogênicas (Costa, 2023). Esse processo de transferência de DNA entre bactérias proximamente relacionadas é intermediado por proteínas codificadas pelo cromossomo bacteriano, que naturalmente são aptas a realizar a transformação (Silva, 2016).

Muitos genes transferidos horizontalmente são organizados em grupos chamados “ilhas genômicas” (GEIs), em regiões de DNA frequentemente inseridas na vizinhança de genes de tRNA e flanqueadas por sequências repetidas. As ilhas genômicas são grandes segmentos de DNA que são adquiridos por um organismo através da transferência horizontal de genes (THG), em vez de serem herdados verticalmente de um ancestral comum. Essas ilhas são inseridas no genoma de um organismo e geralmente possuem características genéticas que as diferenciam do restante do genoma, como uma composição de bases (G+C) distinta ou a presença de genes de mobilidade genética, como transposons e integrases.

As ilhas genômicas frequentemente contêm conjuntos de genes que conferem vantagens adaptativas específicas ao organismo hospedeiro, permitindo-lhe sobreviver e prosperar em novos ambientes ou adquirir novas capacidades biológicas. Dependendo de sua função, essas ilhas podem ser

classificadas em diferentes tipos. As ilhas de patogenicidade, por exemplo, contêm genes que permitem a uma bactéria causar doenças, incluindo fatores de virulência, toxinas e sistemas de secreção. Já as ilhas de resistência incluem genes que conferem resistência a antibióticos ou a outros agentes antimicrobianos.

As ilhas de simbiose abrigam genes que possibilitam interações simbióticas, como aquelas entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas leguminosas. Por fim, ilhas de metabolismo contêm genes que ampliam as capacidades metabólicas de um organismo, permitindo-lhe utilizar novas fontes de nutrientes ou sobreviver em condições ambientais específicas. Os GEIs podem conferir à bactéria receptora uma maior capacidade adaptativa e também uma melhor adequação às mudanças ambientais. Um exemplo importante, e provavelmente o caso mais estudado, de transferência horizontal de GEIs é o dos genes procarióticos necessários para a patogenicidade em hospedeiros eucarióticos.

Com o advento das técnicas de sequenciamento do genoma e programas de bioinformática, diversas informações a respeito de fragmentos de DNA foram descobertas, possibilitando a comparação de genomas de microrganismos inteiros, identificando a similaridade e divergência entre os organismos. Uma descoberta que decorre a partir de tais comparações é que os genomas microbianos podem alojar uma quantidade significativa e variável de DNA de espécies diferentes da sua (Koonin et al., 2001; Nakamura et al., 2004).

Ao longo dos anos, foram descritos diversos mecanismos de THG, que incluem a conjugação (Chen et al., 2004) (Figura 1.1a), transdução (Thomas e Nielsen, 2005) (Figura 1.1c), transformação (Chen e Dubnau, 2004) (Figura 1.1e), Gene Transfer Agents (GTAs) (Lang e Beatty, 2007; McDaniel et al., 2010) (Figura 1.1d) e nanotubos (Dubey e Ben-Yehuda, 2011) (Figura 1.1b).

A capacidade de transferir genes é baseada nas distâncias evolutivas e ecológicas, entretanto, cada um destes mecanismos possui suas peculiaridades (Popa, 2011). A evolução dos GTAs se deu a partir de prófagos que perderam a capacidade de envelopar seu próprio DNA (Lang et al., 2012; Rangel, 2017). Apesar de ocorrerem constantemente na natureza (McDaniel et al., 2010), os GTAs podem apresentar uma ineficiência, já que envelopam fragmentos aleatórios de DNA, e frequentemente não são capazes de envelopar todo seu

material genético (Lang et al., 2012).

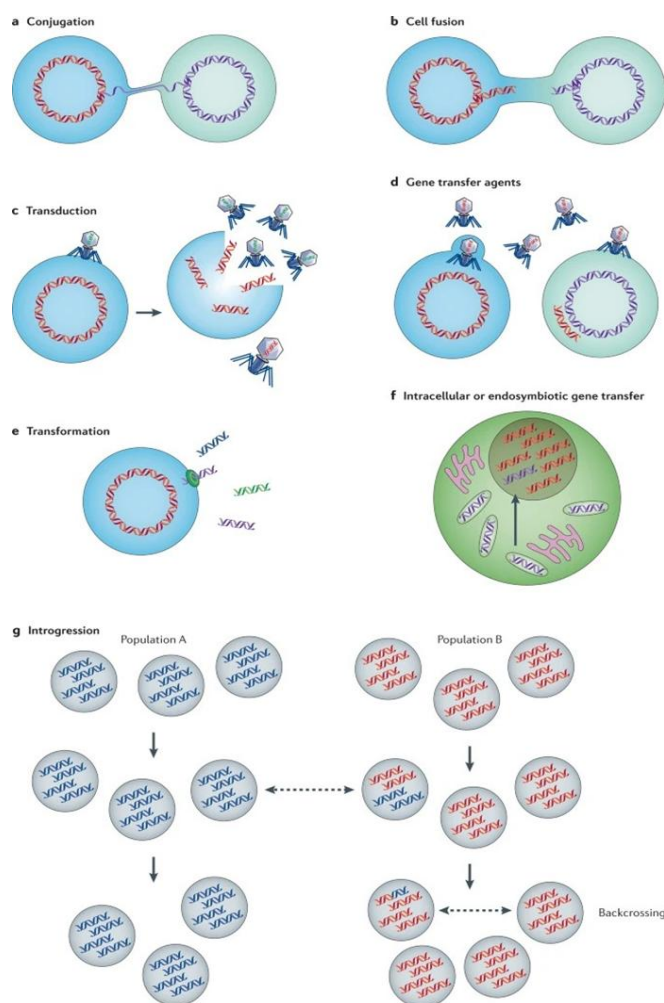


Figura 1: Esquema dos cinco principais mecanismos de THG em procariotos: [a] conjugação; [b] nanotubos (Dubey e Ben-Yehuda, 2011); [c] transdução; [d] GTAs; [e] transformação. Adaptado de Soucy et al. (2015), Rangel (2017).

O mecanismo de THG mais recente descrito ocorre através de nanotubos entre bactérias, cujo comprimento chega a 1 μm e cuja espessura pode variar entre 30 nm e 130 nm. Tais estruturas são compostas por parede celular, membrana plasmática e citoplasma, com capacidade de transferir diversos tipos de moléculas, grandes e pequenas, além de ácidos nucleicos (Dubey e Ben-Yehuda, 2011).

Sabe-se que as transferências provenientes da transformação, conjugação e nanotubos sofrem uma influência maior da barreira de

dissimilaridade genômica do que transferências permeadas por transdução ou GTAs. A integração do DNA adquirido por estes meios geralmente ocorre por recombinação homóloga (Thomas, 2005), que necessita de uma maior semelhança entre as sequências recombinantes (Lovett et al., 2002). Essa dependência de similaridade não ocorre com tamanha intensidade na recombinação não homóloga, utilizada por integrases/transposases, já que sua função não requer similaridade entre longos fragmentos de DNA (Thomas e Nielsen, 2005). No caso da transdução, a integração do DNA viral não depende da sua similaridade com o genoma hospedeiro, e como barreiras a esse mecanismo pode-se citar o próprio CRISPR (Marraffini e Sontheimer, 2008) e a especificidade de hospedeiros que o fago em questão é capaz de infectar (Popa e Dagan, 2011).

A principal barreira relacionada à transdução está relacionada a caracteres operacionais do processamento da informação, e não à semelhança de genomas em si, por utilizar recombinação não homóloga (Thomas e Nielsen, 2005; Popa et al., 2011). Embora a sobreposição ambiental seja um fator considerável na transdução, tal barreira biológica não é tão forte quanto a da conjugação e nanotubos, em que é necessária interação física entre o organismo doador e o receptor; e na transformação, onde o DNA é exposto às intempéries do ambiente (Popa e Dagan, 2011; Thomas e Nielsen, 2005; Popa et al., 2017).

A transdução apresenta como características a dependência da letalidade e da especificidade do fago, que as diferenciam dos outros mecanismos. A maior parte dos fagos infecta apenas linhagens distintas dentro de uma mesma espécie, o que os torna mais próximos da recombinação endógena do que da THG (Popa et al., 2017). No entanto, o viés de transferência entre organismos próximos é comum a todos os mecanismos (Andam e Gogarten, 2011; Shapiro et al., 2012; Papke e Gogarten, 2012).

A transferência de genes entre os rizóbios tem sido associada à obtenção de novos padrões que conferem ao receptor uma vantagem seletiva sobre a população em que se encontra (Delamuta et al., 2012). No entanto, os efeitos de um evento de transferência gênica podem ser, além de benéficos, deletérios ou neutros. Estudos recentes demonstraram que os genes de alguns gêneros de rizóbios podem ser transferidos horizontalmente para bactérias nativas do solo,

produzindo rizóbios híbridos que fixam nitrogênio de forma ineficiente no hospedeiro leguminoso (Nandasena et al., 2007).

3.9 Métodos de identificação de THG

Existem diversos métodos que podem ser aplicados para a identificação de THG e, cada método apresenta suas peculiaridades estando constantemente sendo aperfeiçoados (Rangel, 2017). Entretanto, dois métodos são considerados como principais e se baseiam na identificação de regiões do genoma com distintos padrões composicionais, ou ainda na observância de incongruências filogenéticas entre a árvore de um determinado gene e a árvore das espécies onde ele se encontra.

Os genes adquiridos por THG geralmente exibem padrões de composição distintos dos genomas de seus hospedeiros, o que pode ser explicado pelos distintos vieses mutacionais característicos de diferentes organismos (Sharp e Li, 1987; Sharp et al., 2010; Ribeiro, 2017). A maioria dos métodos baseados em desvios composicionais busca identificar diferenças significativas na frequência de certos k-mers em regiões do genoma, comparando-as com a distribuição esperada. As métricas mais utilizadas incluem a frequência de G+C (Lawrence e Ochman, 1997; Karlin et al., 1998), a preferência pelo uso de códons (Sharp e Li, 1987; Karlin et al., 1998; Lawrence e Ochman, 1998) e dinucleotídeos (Karlin et al., 1998). No entanto, várias ferramentas utilizam k-mers de até 12 nucleotídeos (Sandberg et al., 2001; Tsirigos e Rigoutsos, 2005).

As principais vantagens na detecção de genes transferidos horizontalmente por meio de desvios composicionais incluem o baixo custo computacional em relação aos métodos filogenéticos e a ausência da necessidade de múltiplos genomas próximos para comparação. Essa última vantagem é especialmente relevante para estudos com organismos não modelo, onde não existem genomas de linhagens próximas disponíveis. No entanto, os métodos baseados em desvios composicionais apresentam dois problemas principais: uma alta taxa de erro (Koski et al., 2001; Azad e Lawrence, 2005) e a limitação de identificar apenas genes adquiridos recentemente. Essa limitação ocorre devido ao rápido processo de adaptação da sequência do gene transferido ao genoma do hospedeiro, conhecido como melhoria (Lawrence

e Ochman, 1997). Entre as ferramentas mais utilizadas estão: Dark Horse (Podell e Gaasterland, 2007), COLOMBO SIGI-HMM (Waack et al., 2006), IslandPath (Hsiao et al., 2005) e AlienHunter (Vernikos e Parkhill, 2006).

O círculo mais externo e o segundo círculo mostram as posições dos genes codificadores de proteínas putativos, nas direções horária e anti-horária, respectivamente (Figura 2). O terceiro, quarto e quinto círculos, a partir de fora, representam comparações BLASTN com *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, *Bradyrhizobium* sp. ORS278 e *B. japonicum* USDA110, respectivamente (E-value $<10^{-10}$). Os círculos mais interno e o segundo mais interno mostram o desvio de GC e o conteúdo de GC, respectivamente. O círculo de conteúdo de GC mostra o desvio em relação ao conteúdo médio de GC de toda a sequência (conteúdo de GC superior à média em verde, inferior à média em roxo). As marcações dentro do círculo mais interno representam as posições do genoma em Mb. As posições da possível origem de replicação, possível terminus de replicação, genes de fixação de nitrogênio e genes fotossintéticos estão indicadas fora do círculo mais externo.

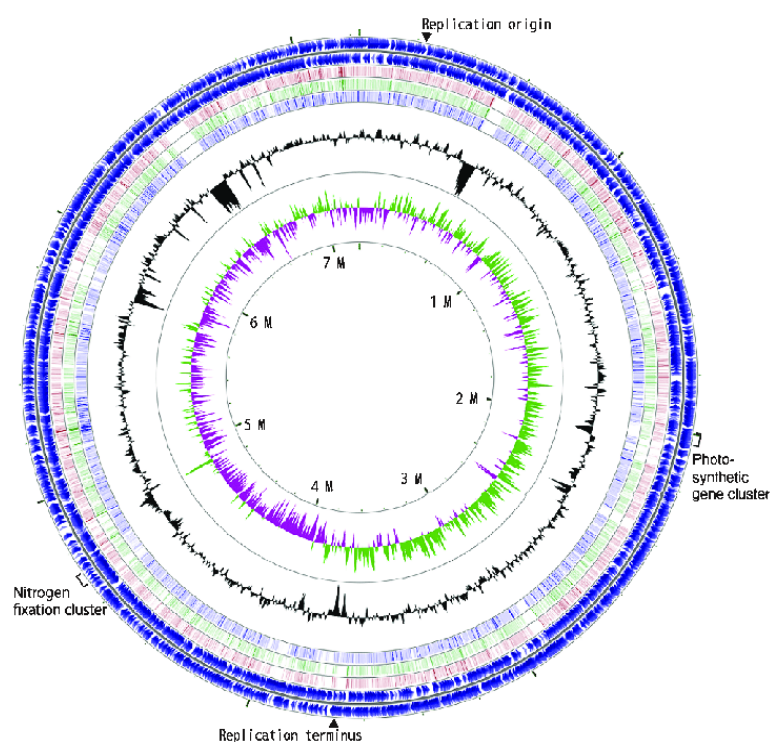


Figura 2: Exemplo de análise de perfil composicional do genoma de *Bradyrhizobium* sp. S23321 em representação circular do cromossomo. Adaptado de Okubo et al. (2012).

3.10 Incongruência e Redes Filogenéticas

Este grupo inclui métodos que procuram detectar THG, ao identificar inconsistências entre a topologia observada na árvore filogenética de um gene e a topologia esperada da árvore que representa os organismos em estudo. Como mencionado anteriormente, as transferências horizontais costumam ser reconhecidas por mudanças significativas na topologia da árvore gênica, e essa abordagem é empregada por diversas ferramentas (Zhaxybayeva et al., 2006; Bansal et al., 2012; Mao et al., 2012).

Métodos que seguem essa abordagem geralmente exigem um tempo computacional significativo, pois a inferência filogenética é essencial para garantir a precisão da análise. Para contornar essa limitação, que dificulta análises precisas com um grande número de táxons, o servidor de decomposição Quartet, desenvolvido por Mao et al. (2012), recomenda o uso de 20 táxons, com um máximo de 100 e o método de Novichkov et al. (2004) utiliza a comparação de matrizes de distância emparelhadas. Como os métodos baseados nessa abordagem apresentam maior precisão em comparação com os baseados em desvios composicionais, há uma tendência ao seu uso em análises mais robustas.

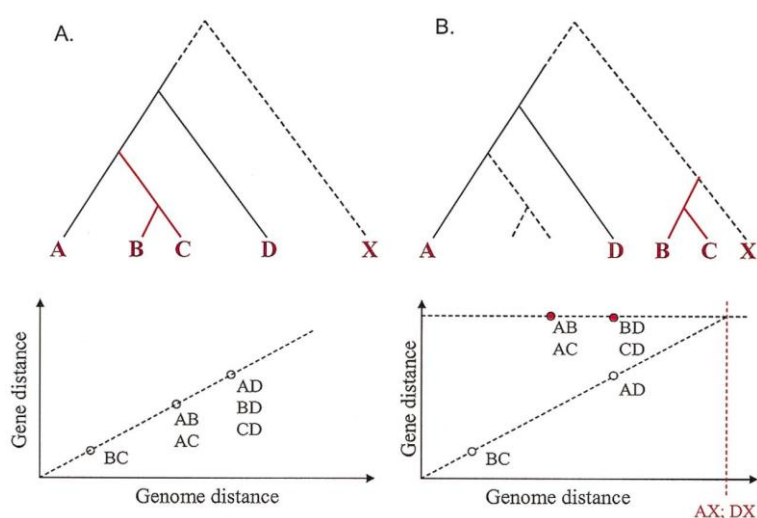


Figura 3: (A) Relação esperada entre distâncias gênicas e genômicas quando o gene evolui exclusivamente por herança vertical, resultando em congruência entre a árvore gênica e a genômica. (B) Incongruência observada nas distâncias entre pares quando ocorre transferência horizontal de genes, exemplificada pelo evento dirigido de um ancestral de X para um ancestral de B e C. Adaptado de Novichkov et al. (2004).

Uma rede, ou grafo, é um modelo matemático composto por um conjunto de vértices (nós) interconectados por arestas. Essas arestas podem ter pesos, indicando a intensidade das conexões entre os vértices, ou direções. Em redes filogenômicas, os vértices representam genomas, enquanto as arestas indicam o compartilhamento de genes entre esses genomas. O peso das arestas reflete o número de genes compartilhados, e a direção das arestas pode indicar a direção de possíveis eventos de transferência horizontal de genes (THG), com a aresta orientada do genoma doador para o receptor. Nesse modelo, o compartilhamento de genes entre genomas pode ocorrer de duas formas: pela herança vertical de um ancestral comum ou por transferência lateral. No caso de transferência lateral, não é necessariamente implicado que a aresta reflete uma transferência direta entre dois genomas, pois, na maioria dos casos, pode haver vários passos intermediários não representados no modelo. Considera-se que, devido à sua versatilidade, o modelo de redes é mais apropriado para representar a evolução de procariotos do que o modelo dicotômico (Feil et al., 2001; Gogarten et al., 2002; Baptiste et al., 2009; Martin, 2011).

Como mencionado anteriormente, as transferências horizontais de genes (THGs) desempenham um papel crucial na evolução dos procariotos, sendo o principal mecanismo de inovação genômica e impactando praticamente todas as famílias gênicas. Por esse motivo, a evolução dos genomas procariotos não pode ser representada por modelos dicotômicos (como árvores filogenéticas), pois os genomas são mosaicos compostos por fragmentos provenientes de diferentes fontes (Snel et al., 2002).

O modelo de árvores dicotômicas foi desenvolvido com base em dois mecanismos de inovação: variações hereditárias e seleção natural, que explicam bem a evolução de eucariotos multicelulares. No entanto, hoje se sabe que a evolução não é exclusivamente darwinista (Koonin e Wolf, 2009), e que os mecanismos de variação natural variam entre as formas de vida, sendo particularmente diferentes entre eucariotos e procariotos (Baptiste et al., 2009). Ao contrário dos processos evolutivos predominantes em eucariotos, eventos de transferência horizontal de genes (THG) podem introduzir genes ou grupos de genes que fornecem funcionalidades complexas a organismos, permitindo-lhes explorar novos nichos (Lawrence, 1998; Lawrence e Ochman, 1997; Hacker e Kaper, 2000), inserir-se e adaptar-se a hospedeiros e condições ambientais

(Hernández-Oaxaca, 2023).

Análises filogenéticas têm contribuído para a compreensão das relações evolutivas entre essas estirpes, mostrando como diferentes fatores ecológicos e geográficos influenciam a diversificação genética (Helene, 2015). Além disso, estudos que empregam técnicas bioinformáticas avançadas têm identificado padrões de transferência horizontal de genes, o que pode explicar parte da plasticidade genômica observada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alambert, M. R. (2010) *Estimação estocástica de parâmetros produtivos da soja uso do modelo PPDSO em um estudo de caso em Piracicaba/SP* (Dissertação) Mestrado Profissional em Agroenergia. Fundação Getúlio Vargas, Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, 108p.
- Andam, C. P., & Gogarten, J. P. (2011). Biased gene transfer in microbial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 9(7), 543-555.
- Avontuur, J. R., Palmer, M., Beukes, C. W., Chan, W. Y., Coetzee, M. P., Blom, J., ... & Steenkamp, E. T. (2019). Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Systematic and applied microbiology*, 42(4), 427-439.
- Azad, R. K., & Lawrence, J. G. (2005). Use of artificial genomes in assessing methods for atypical gene detection. *PLoS Computational Biology*, 1(6), e56.
- Bansal, M. S., Alm, E. J., & Kellis, M. (2012). Efficient algorithms for the reconciliation problem with gene duplication, horizontal transfer and loss. *Bioinformatics*, 28(12), i283-i291.
- Bapteste, E., O'Malley, M. A., Beiko, R. G., Ereshefsky, M., Gogarten, J. P., Franklin-Hall, L., ... & Martin, W. (2009). Prokaryotic evolution and the tree of life are two different things. *Biology direct*, 4(1), 34.
- Barrera, L. L., Trujillo, M. E., Goodfellow, M., Garcia, F. J., Hernandez-Lucas, I., Davila, G., ... & Martinez-Romero, E. (1997). Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1086-1091.
- Batista, J. N. (2022). Modelos mistos e GGE biplot na seleção de genótipos de soja para a região Norte Fluminense. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goycazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro 82 p.
- Beijerinck, M. W. (1888). Die bacterien der papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung*, 46, 725.
- Bejarano, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Peix, A. (2014). *Vigna unguiculata* is nodulated in Spain by endosymbionts of Genisteeae legumes and by a new symbiovar (vignae) of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(7), 533-540.
- Beukes, C. W., Palmer, M., Manyaka, P., Chan, W. Y., Avontuur, J. R., van Zyl, E., ... & Steenkamp, E. T. (2017). Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia* sensu lato. *Frontiers in microbiology*, 8, 1154.

- Black, R. J. (2000) Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. *Soja: tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ*, 1-18.
- Braccini, A. L., Mariucci, G. E. G., Suzukawa, A. K., da Silva Lima, L. H., & Piccinin, G. G. (2016) Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. *Scientia Agraria Paranaensis*, 27-35.
- Bredemeier, C., & Mundstock, C. M. (2000) Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural*, 30, 365-372.
- Bullard, G. K., Roughley, R. J., & Pulsford, D. J. (2005) The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia: 1953–2003. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(3), 127-140.
- Busse, H. J., Denner, E. B., Buczolits, S., Salkinoja-Salonen, M., Bennisar, A., & Kampfer, P. (2003). *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air- and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1253-1260.
- Caovilla, F. A., Sampaio, S. C., Pereira, J. O., Boas, M. A. V., Gomes, B. M., & Figueirêdo, A. D. C. (2005). Lixiviação de nutrientes provenientes de águas residuárias em colunas de solo cultivado com soja. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 9(supl 1), 283-287
- Carrão-Panizzi, M. C., & Hinson, K. (1989). Potencialidade do caráter folha estreita em soja tipo vegetal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, p. 879-886.
- Castenholz, R. W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J. B., Iteman, I., & Hoffmann, L. (2001). Phylum BX. cyanobacteria. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume one: the archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria* (pp. 473-599). New York, NY: Springer New York.
- Chaves, J. D. S., Oliveira, G. A., Rodrigues, T. G., Maia, S. D. S., Teixeira Junior, D. L., Sousa, F. G., & Rodríguez, C. A. (2018). Produtividade do feijão-caupi sob inoculação em área alterada no estado de Roraima–Brasil. *Nucleus*, 15(2), 319-324.
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 241-249.
- Chen, X., Chen, H. Y., Searle, E. B., Chen, C., & Reich, P. B. (2021) Negative to positive shifts in diversity effects on soil nitrogen over time. *Nature Sustainability*, 4(3), 225-232.

- Cobo-Díaz, J. F., Martínez-Hidalgo, P., Fernández-González, A. J., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E., & Fernández-López, M. (2014). The endemic *Genista versicolor* from Sierra Nevada National Park in Spain is nodulated by putative new *Bradyrhizobium* species and a novel symbiovar (sierranevadense). *Systematic and applied microbiology*, 37(3), 177-185.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) (2003). Acompanhamento da Safra de Mendonça, J. L., & Carrão-Panizzi, M. C. Soja verde: soja hortaliça. dezembro 2024. Disponível em: <http://www.conab.gov.br> . Acesso em: 11 de jan. de 2025.
- Costa, S. C., Machado, A. P., Teixeira, C., Cerqueira, L., Rodrigues, T., Ribeiro, M., & Moucho, M. (2023). Group B Streptococcus rectovaginal colonization screening on term pregnancies: culture or polymerase chain reaction?. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 36(2), 2262078.
- Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M. A., Delamuta, J. R. M., Andrade, D. S., ... & Hungria, M. (2013). *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_11), 4167-4173.
- de Freitas, J. M., Dutra, G. A., Moreira, G. R. N., Rezende, C. F. A., Fernandes, F. R., & Antà, R. (2021). Inoculação e co-inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial do grão-de-bico cristalino. *Anais do Programa de Iniciação Científica da UniEVANGÉLICA*, 11, 19-21.
- de Lajudie, P. M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., ... & Young, P. (2019). Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(7), 1852-1863.
- de Mendonça, G. M. N., de Oliveira, A. F., de Oliveira, M. A., & Coelho, A. (2017). Elaboração de brotos de soja em conserva. *Embrapa Soja-Capítulo em livro científico (ALICE)*.
- de Mendonça, J. L., & Carrão-Panizzi, M. C. (2003). Soja verde: soja hortaliça.
- Delamuta, J. R. M., Menna, P., Ribeiro, R. A., & Hungria, M. (2017). Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrrhizi and sojae. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(5), 254-265.
- Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Menna, P., Bangel, E. V., & Hungria, M. (2012). Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains:

- revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 698-710.
- Delamuta, J. R. M., Scherer, A. J., Ribeiro, R. A., & Hungria, M. (2020). Genetic diversity of *Agrobacterium* species isolated from nodules of common bean and soybean in Brazil, Mexico, Ecuador and Mozambique, and description of the new species *Agrobacterium fabacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(7), 4233-4244.
- Dias dos Santos, F., Aparecida Fantinel, R., Broetto Weiler, E., & Cabral Cruz, J. (2021) Fatores que afetam a disponibilidade de micronutrientes no solo. *Tecno-Lógica*, 25(2), 272-278.
- Dias, M. A. M. (2020). *Fixação Biológica de Nitrogênio: características moleculares e simbióticas de bactérias nativas do Semiárido Brasileiro*. Editora Dialética.
- DIONISIO, J. A., PIMENTEL, I. C., SIGNOR, D., (2016) Isolamento de rizóbios de raízes de leguminosas. In: J.A. Dionisio, I.C. Pimentel, D. Signor, A.M. Paula, A. Maceda, A.L. Matanna, eds. *Guia prático de biologia do solo*. Curitiba: SBCS/NEPAR. pp. 60-66. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1043646>
- Dolgikh, A. V., Salnikova, E. A., Dymo, A. M., Kantsurova, E. S., Aksenova, T. S., Yuzikhin, O. S., ... & Dolgikh, E. A. (2025). Characterization and De Novo Genome Assembly for New *Rhizobium Ruizarguesonis* Rhizobial Strain Vst36-3 Involved in Symbiosis with *Pisum* and *Vicia* Plants. *Current Microbiology*, 82(6), 284.
- Dubey, G. P., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144(4), 590-600.
- EMBRAPA (2018) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Soja no Brasil: principais regiões produtoras e características agrônomicas*. Embrapa Soja.
- Estrada-de Los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E. T., Briscoe, L., ... & James, E. K. (2018). Whole genome analyses suggests that *Burkholderia sensu lato* contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the *Burkholderiaceae*. *Genes*, 9(8), 389.
- FAOSTAT – (2024) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data> . Acesso em: 13 de maio de 2024.
- Faxo, A., Glass, F., Guth, P., & Dutra, R. (2017) Evolução do cultivo da soja no Brasil de 1980 a 2015. *Encitec: Criar, Inovar e Empreender*, 13, 1-9
- Feil, E. J., & Spratt, B. G. (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 561-590.

- Fred. Griffith. (1981). The significance of pneumococcal types. *Reviews of Infectious Diseases*, 372-395.
- Freitas, M. (2011) A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. *Enciclopédia Biosfera*, 7(12).
- Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., Mongiardini, E., Blanco-Romero, E., Durán, D., Quelas, J. I., ... & Althabegoiti, M. J. (2019). Phylogenomic analyses of *Bradyrhizobium* reveal uneven distribution of the lateral and subpolar flagellar systems, which extends to Rhizobiales. *Microorganisms*, 7(2), 50.
- Gazzoni, D. L., & Dall'agnol, A. (2018) A saga da soja: de 1050 aC a 2050 dC. Brasília, DF: Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1101966/a-saga-da-soja-de-1050-ac-a-2050-dc>.
- Glyan'Ko, A. K. (2018). Legume-rhizobial symbiosis: Progress and prospects. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 14(2), 36-57.
- Gogarten, J. P., Doolittle, W. F., & Lawrence, J. G. (2002). Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2226-2238.
- Graham, P. H. (1976). Identification and classification of root nodule bacteria. In P. S. Nutman (Ed.), *Symbiotic nitrogen fixation in plants* (pp. 99-112). Cambridge University Press.
- Gross, N., Bagousse-Pinguet, Y. L., Liancourt, P., Berdugo, M., Gotelli, N. J., & Maestre, F. T. (2017). Functional trait diversity maximizes ecosystem multifunctionality. *Nature ecology & evolution*, 1(5), 0132.
- Guinel, F. C. (2015). Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1121.
- Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 641-679.
- Hara, F. A. S., & Oliveira, L. A. (2019). Efectividade simbiótica de isolados de rizóbios em caupi (*Vigna unguiculata* L. walp) em latossolo ácido e álico na Amazônia. *Brazilian Journal of Development*, 5(12), 28310-28324.
- Helene, L. C. F. (2015). Diversidade entre estirpes do gênero *Bradyrhizobium* avaliada por Multilocus Sequence Analysis (MLSA) e Análise Polifásica. (Dissertação) Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 76p.
- Helene, L. C. F., Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Hungria, M., & Da Cunha, M. H. (2014) Estudo filogenético da diversidade do gênero *Bradyrhizobium* por MLSA e utilização desta técnica para designar possíveis novas

- espécies. *Anais: XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental* (ENAMA), João Pessoa – Paraíba – Brasil, 86-1.
- Hernández-Oaxaca, D., Claro, K., Rogel, M. A., Rosenblueth, M., Martinez-Romero, J., & Martinez-Romero, E. (2023). Novel symbiovars *ingae*, *lysilomae* and *lysilomaefficiens* in *bradyrhizobia* from tree-legume nodules. *Systematic and Applied Microbiology*, 46(4), 126433.
- Hsiao, W. W. L., Ung, K., Aeschliman, D., Bryan, J., Finlay, B. B., & Brinkman, F. S. L. (2005). Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands. *PLoS genetics*, 1(5), e62.
- Hungria, M., & Kaschuk, G. (2014). Regulation of N₂ fixation and NO₃⁻/NH₄⁺ assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 32-39.
- Hungria, M., & Mendes, I. C. (2015). Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? *Biological nitrogen fixation*, 1009-1024.
- Hungria, M., Campo, R. J., & Mendes, I. D. C. (2001) Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. (Vol. 35). Embrapa Soja; Brasília, DF: Embrapa Cerrados.
- Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, I. C. (2007) A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Embrapa Soja- Documentos (INFOTECA-E).
- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2013). Tecnologia de coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In *Anais da 33ª Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil* (pp. 151-153). Embrapa Soja.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., Campos, L. J. M., Menna, P., Brandi, F., & Ramos, Y. G. (2020). Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. *Agronomy Journal*, 112(6), 5222-5236.
- Jones, F. P., Clark, I. M., King, R., Shaw, L. J., Woodward, M. J., & Hirsch, P. R. (2016). Novel European free-living, non-diazotrophic *Bradyrhizobium* isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes—a genome comparison. *Scientific reports*, 6(1), 25858.
- Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(1), 136-139.

- Kalita, M., & Małek, W. (2019). The *ftsA* gene as a molecular marker for phylogenetic studies in *Bradyrhizobium* and identification of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of applied genetics*, 60(1), 123-126.
- Karlin, S., Mrázek, J., & Campbell, A. M. (1998). Codon usages in different gene classes of the *Escherichia coli* genome. *Molecular microbiology*, 29(6), 1341-1355.
- Kishorekumar, R., Bulle, M., Wany, A., & Gupta, K. J. (2020). An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants. In *Nitrogen metabolism in plants: Methods and protocols* (pp. 1-13). New York, Humana.
- Klepa, M. S., Ferraz Helene, L. C., O'Hara, G., & Hungria, M. (2021). *Bradyrhizobium agreste* sp. nov., *Bradyrhizobium glycinis* sp. nov. and *Bradyrhizobium diversitatis* sp. nov., isolated from a biodiversity hotspot of the genus *Glycine* in Western Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(3), 004742.
- Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2009). Is evolution Darwinian or/and Lamarckian?. *Biology direct*, 4(1), 42.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Aravind, L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 709-742.
- Koski, L. B., Morton, R. A., & Golding, G. B. (2001). Codon bias and base composition are poor indicators of horizontally transferred genes. *Molecular biology and evolution*, 18(3), 404-412.
- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., & Beatty, J. T. (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), 472-482.
- Lawrence, J. (1999). Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. *Current opinion in genetics & development*, 9(6), 642-648.
- Lawrence, J. G., & Ochman, H. (1997). Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *Journal of molecular evolution*, 44(4), 383-397.
- Lawrence, JG, & Ochman, H. (1998). Arqueologia molecular do genoma de *Escherichia coli*. *Anais da Academia Nacional de Ciências*, 95 (16), 9413-9417.
- Lovett, G. M., Weathers, K. C., & Arthur, M. A. (2002). Control of nitrogen loss from forested watersheds by soil carbon: Nitrogen ratio and tree species composition. *Ecosystems*, 5(7), 0712-0718.
- Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS microbiology reviews*, 15(2-3), 155-173.

- Mao, F., Williams, D., Zhaxybayeva, O., Poptsova, M., Lapierre, P., Gogarten, J. P., & Xu, Y. (2012). Quartet decomposition server: a platform for analyzing phylogenetic trees. *BMC bioinformatics*, 13(1), 123.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *science*, 322(5909), 1843-1845.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., & Willems, A. (2007). Análise de sequência multilocus de *Ensifer* e táxons relacionados. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (3), 489-503.
- Martin, W. F. (2011). Early evolution without a tree of life. *Biology direct*, 6(1), 36.
- Martínez-Romero, J. C., Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M. A., López-López, A., & Martínez-Romero, E. (2010, July). Trends in rhizobial evolution and some taxonomic remarks. In *Evolutionary Biology–Concepts, Molecular and Morphological Evolution: 13th Meeting 2009* (pp. 301-315). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Martins da Costa, E., Soares de Carvalho, T., Azarias Guimarães, A., Ribas Leão, A. C., Magalhães Cruz, L., de Baura, V. A., ... & de Souza Moreira, F. M. (2019). Classification of the inoculant strain of cowpea UFLA03-84 and of other strains from soils of the Amazon region as *Bradyrhizobium viridifuturi* (symbiovar tropici). *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(2), 335-345.
- McDaniel, L. D., Young, E., Delaney, J., Ruhnau, F., Ritchie, K. B., & Paul, J. H. (2010). High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science*, 330(6000), 50-50.
- Menna, P., & Hungria, M. (2011). Filogenia de genes de nodulação e fixação de nitrogênio em *Bradyrhizobium*: evidências de apoio à teoria de origem monofilética, e disseminação e manutenção por transferência horizontal e vertical. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61 (12), 3052-3067.
- Missão, M. R. (2008) Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. Maringá Management: *Revista de ciências empresariais*, 3(1), 7-15.
- Moreira, F. D. S., & Siqueira, J. O. (2006). Microbiologia e bioquímica do solo. *Lavras, MG, 2 ed., Editora UFLA*, 744p.
- Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., & Stępkowski, T. (2004). Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular phylogenetics and evolution*, 30(3), 720-732.
- Müller, L. (1981) Morfologia, anatomia e desenvolvimento. *A soja no Brasil. Campinas: ITAL*.

- Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., & Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature genetics*, 36(7), 760-766.
- Nandasena, K. G., O'Hara, G. W., Tiwari, R. P., Sezmiş, E., & Howieson, J. G. (2007). In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2496-2511.
- Nepomuceno, M. P., Varela, R. M., Alves, P. L. C. A., & Martins, J. V. F. (2012). Períodos de dessecação de *Urochloa ruziziensis* e seu reflexo na produtividade da soja RR. *Planta Daninha*, 30, 557-565.
- Novichkov, P. S., Omelchenko, M. V., Gelfand, M. S., Mironov, A. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2004). Genome-wide molecular clock and horizontal gene transfer in bacterial evolution. *Journal of bacteriology*, 186(19), 6575-6585.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *nature*, 405(6784), 299-304.
- Okazaki, S., Noisangiam, R., Okubo, T., Kaneko, T., Oshima, K., Hattori, M., ... & Teaumroong, N. (2015). Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. *PloS one*, 10(2), e0117392.
- Okubo, T., Tsukui, T., Maita, H., Okamoto, S., Oshima, K., Fujisawa, T., ... & Minamisawa, K. (2012). Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. S23321: insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. *Microbes and environments*, 27(3), 306-315.
- Ormeño-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2019). A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus. *Frontiers in microbiology*, 10, 1334.
- Ormeno-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L. E., Rogel, M. A., González, V., Peralta, H., Mora, J., ... & Martínez-Romero, E. (2015). Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 287-291.
- Ormeno-Orrillo, E., Vinuesa, P., Zuniga-Davila, D., & Martínez-Romero, E. (2006). Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Systematic and applied microbiology*, 29(3), 253-262.
- Palmer, D. J., Turner, D. L., & Ng, P. (2020). A single “all-in-one” helper-dependent adenovirus to deliver donor DNA and CRISPR/Cas9 for efficient homology-directed repair. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 17, 441-447.
- Papke, R. T., & Gogarten, J. P. (2012). How bacterial lineages emerge. *Science*, 336(6077), 45-46.

- Podell, S., & Gaasterland, T. (2007). DarkHorse: a method for genome-wide prediction of horizontal gene transfer. *Genome biology*, 8(2), R16.
- Pontes, D. S., Lima-Bittencourt, C. I., Chartone-Souza, E., & Amaral Nascimento, A. M. (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(7), 463-473.
- Popa, O., & Dagan, T. (2011). Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Current opinion in microbiology*, 14(5), 615-623.
- Popa, O., Hazkani-Covo, E., Landan, G., Martin, W., & Dagan, T. (2011). Directed networks reveal genomic barriers and DNA repair bypasses to lateral gene transfer among prokaryotes. *Genome research*, 21(4), 599-609.
- Popa, O., Landan, G., & Dagan, T. (2017). Phylogenomic networks reveal limited phylogenetic range of lateral gene transfer by transduction. *The ISME journal*, 11(2), 543-554.
- Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Chahboune, R., Toro, M., Velázquez, E., & Peix, A. (2016). *Bradyrhizobium centrosemae* (symbiovar *centrosemae*) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar *phaseolarum*) sp. nov. and a new symbiovar (*tropici*) of *Bradyrhizobium viridifuturi* establish symbiosis with *Centrosema* species native to America. *Systematic and applied microbiology*, 39(6), 378-383.
- Rangel, L. T. L. D. (2017). O papel de transferência horizontal de genes na história evolutiva de duas classes de genes em bactérias [Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo]. 108f. *Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP*.
- Ribeiro, T., Marques, A., Novák, P., Schubert, V., Vanzela, AL, Macas, J., ... & Pedrosa-Harand, A. (2017). A organização do DNA satélite centromérico e não centromérico difere em espécies holocêntricas de *Rhynchospora*. *Chromosoma*, 126 (2), 325-335.
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131.
- Rivas, R., Martens, M., De Lajudie, P., & Willems, A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(2), 101-110.
- Rogel, M. A., Ormeno-Orrillo, E., & Romero, E. M. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96-104.
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.

- Salmi, A., & Boulila, F. (2021). Heavy metals multi-tolerant *Bradyrhizobium* isolated from mercury mining region in Algeria. *Journal of environmental management*, 289, 112547.
- Sandberg, R., Winberg, G., Bränden, C. I., Kaske, A., Ernberg, I., & Cöster, J. (2001). Capturing whole-genome characteristics in short sequences using a naive Bayesian classifier. *Genome research*, 11(8), 1404-1409.
- Sankhla, M. S., Sharma, K., & Kumar, R. (2017). Heavy metal causing neurotoxicity in human health. *International Journal of Innovative Research in Science. Engineering and Technology*, 6(5).
- Schleifer, K. H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and applied microbiology*, 32(8), 533-542.
- Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Annual review of microbiology*, 37(1), 143-187.
- Sentausa, E., & Fournier, P. E. (2013). Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 790-795.
- Shapiro, B. J., Friedman, J., Cordero, O. X., Preheim, S. P., Timberlake, S. C., Szabó, G., ... & Alm, E. J. (2012). Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. *Science*, 336(6077), 48-51.
- Sharp, P. M., & Li, W. H. (1987). The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids research*, 15(3), 1281-1295.
- Sharp, PM, Emery, LR, & Zeng, K. (2010). Forças que influenciam a evolução do viés de códons. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365 (1544), 1203-1212.
- Sider, L. H. S., & Zaros, L. G. (2008). *A biologia avançada e o impacto da genômica na produção de caprinos e ovinos* (Vol. 78). Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos.
- Silva, T. M., Milbradt, E. L., Zamae, J. C., Andreatti Filho, R. L., & Okamoto, A. S. (2016). Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária-Impactos em saúde pública. *Archives of Veterinary Science [Online]*, 21(2), 9-20.
- Snel, B., Bork, P., & Huynen, M. A. (2002). Genomes in flux: the evolution of archaeal and proteobacterial gene content. *Genome research*, 12(1), 17-25.
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472-482.
- Sperb, E. R. (2018). Expressão de genes envolvidos nas etapas iniciais do estabelecimento da simbiose entre *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 e

soja [*Glycine max* (L.)] submetida ao déficit hídrico. [Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul]. 112f. *Lume - Repositório Digital da UFRGS*.

- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., ... & Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 1043-1047.
- Stepkowski, T., Hughes, C. E., Law, I. J., Markiewicz, Ł., Gurda, D., Chlebicka, A., & Moulin, L. (2007). Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3254-3264.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora.
- Takeuchi, T., Nakanishi, Y., & Ohno, H. (2024). Microbial metabolites and gut immunology. *Annual review of immunology*, 42(1), 153-178.
- Telles, T. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2023). Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. *Environmental Technology & Innovation*, 31, 103158.
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711-721.
- Tsirigos, A., & Rigoutsos, I. (2005). A new computational method for the detection of horizontal gene transfer events. *Nucleic acids research*, 33(3), 922-933.
- Urano, E. O. M., Kurihara, C. H., Maeda, S., Vitorino, A. C. T., Gonçalves, M. C., & Marchetti, M. E. (2006). Avaliação do estado nutricional da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1421-1428.
- Van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindstrom, K., & Eardly, B. D. (2003). Filogenias discordantes dentro dos loci *rrn* de rizóbios. *Journal of Bacteriology*, 185 (10), 2988-2998.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.
- Vernikos, G. S., & Parkhill, J. (2006). Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics*, 22(18), 2196-2203.
- Vieira, R. F. (2017) *Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas*. 21. ed. Brasília, DF: Embrapa.

- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., ... & Martínez-Romero, E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 569-575.
- Waack, S., Keller, O., Asper, R., Brodag, T., Damm, C., Fricke, W. F., ... & Merkl, R. (2006). Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. *BMC bioinformatics*, 7(1), 142.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Wu, M., & Scott, A. J. (2012). Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. *Bioinformatics*, 28(7), 1033-1034.
- Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., & Papke, R. T. (2006). Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. *Genome research*, 16(9), 1099-1108.
- Zilli, J. É., Smiderle, O. J., & Fernandes Júnior, P. I. (2010) The effectiveness of different formulations of inoculants containing *Bradyrhizobium* on the soybean crop in Roraima. *Agro@mbiente On-line*, vol. 4, No. 2, 56-61 ref. 24.
- Zilli, J. É., Valicheski, R. R., Rumjanek, N. G., Simões-Araújo, J. L., Freire Filho, F. R., & Neves, M. C. P. (2006) Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 811-818.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Rossano, R., Storelli, C., & Vilella, S. (2005). Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biology of Reproduction*, 72(5), 1262-1267.
- Zoppas, F. M., Bernardes, A. M., & Meneguzzi, Á. (2016). Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 21(01), 29-42.

AValiação DA MOBILIDADE SIMBIÓTICA E TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES EM RIZÓBIO DE SOJA DE ESTIRPES BRASILEIRAS E AUSTRALIANAS.

RESUMO

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* representam a maioria dos isolados de leguminosas tropicais nativas e possuem grande importância como simbiossantes em culturas agrícolas, como a soja. Com os avanços tecnológicos no sequenciamento genômico, tem sido possível obter genomas bacterianos com maior precisão e completude. Esses avanços permitiram a identificação de uma alta porcentagem de genes adquiridos por transferência horizontal de genes (THG), revolucionando a compreensão da evolução e da especiação bacteriana. Ferramentas computacionais avançadas, têm refinado a detecção de eventos de THG, evidenciando a complexidade dos fluxos genéticos entre diferentes linhagens. Quatro cepas de *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080) foram utilizadas como inoculantes e são recomendadas para o cultivo da soja brasileira desde 1992. A Austrália utiliza cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (CB1809) como inoculante comercial para soja desde 1960. Na Austrália, não há investigações genéticas recentes sobre a diversidade de rizóbios noduladores da soja em áreas de cultivo dessa leguminosa de grãos. Este estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade genética e a eficiência simbiótica de 13 cepas de rizóbios noduladores de soja, isoladas de plantas cultivadas em áreas produtivas do Brasil e da Austrália. As cepas foram autenticadas e depois genotipadas. A investigação se deu através da extração dos genes simbióticos e do uso dos dados para posterior análise genômica. A partir desses dados, foi possível determinar o impacto da transferência simbiótica horizontal de genes na eficiência da fixação de N₂. Análises genômicas e filogenéticas de cepas de *Bradyrhizobium* revelaram relações evolutivas complexas e diversidade genética influenciadas por transferência horizontal de genes (THG), adaptação ambiental e interações com hospedeiros. Árvores filogenéticas, construídas com dados genômicos e marcadores-chave (16S rRNA, nodC, nodD), demonstraram agrupamentos não monofiléticos, sugerindo trajetórias evolutivas divergentes entre as cepas. Valores elevados de suporte bootstrap (>85% em média) confirmaram clados robustos, com cepas como BR 14864, BR 14865 e BR 96 agrupando-se intimamente, indicando traços genéticos e adaptativos compartilhados. Notavelmente, cepas isoladas de nódulos de soja em solos amazônicos e de Mata Atlântica (ex.: BR 14864, BR 14865) mostraram proximidade filogenética com a linhagem de inoculante comercial BR 96, sugerindo possíveis eventos de reisolamento ou contaminação. Incongruências filogenéticas entre as árvores de 16S rRNA e genômicas destacaram limitações de análises de gene único e o impacto da THG em genes relacionados à simbiose (nod, nif). A dominância de *B. elkanii* entre cepas brasileiras alinhou-se com seu uso histórico na agricultura, enquanto cepas divergentes como BR 3287 sugeriram eventos extensivos de THG, principalmente em solos ácidos e pobres em nutrientes.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*, Genômica, Fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bradyrhizobium* represent the majority of isolates obtained from native tropical legumes and are of great importance as symbionts in agricultural crops, such as soybean. With technological advancements in genomic sequencing, it has become possible to obtain bacterial genomes with greater precision and completeness. These advances have enabled the identification of a high percentage of genes acquired through horizontal gene transfer (HGT), revolutionizing the understanding of bacterial evolution and speciation. Advanced computational tools have refined the detection of HGT events, highlighting the complexity of gene flow between different lineages. Four *Bradyrhizobium* spp. strains (SEMIA 587, 5019, 5079, and 5080) have been used as inoculants and recommended for Brazilian soybean cultivation since 1992. Australia has used *Bradyrhizobium japonicum* strains (CB1809) as a commercial soybean inoculant since 1960. In Australia, there is a lack of recent genetic investigations regarding the diversity of soybean-nodulating rhizobia in cultivation areas of this grain legume. This study aimed to characterize the genetic diversity and symbiotic efficiency of 13 soybean-nodulating rhizobial strains isolated from plants cultivated in Brazil and Australia. The strains were authenticated and subsequently genotyped. The investigation was conducted through the extraction of symbiotic genes and the use of these data for subsequent genomic analyses. From these data, it was possible to determine the impact of horizontal transfer of symbiotic genes on biological N₂ fixation efficiency. Genomic and phylogenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains revealed complex evolutionary relationships and genetic diversity influenced by horizontal gene transfer (HGT), environmental adaptation, and host interactions. Phylogenetic trees, constructed using genomic data and key markers (16S rRNA, nodC, nodD), demonstrated non-monophyletic groupings, suggesting divergent evolutionary trajectories among the strains. High bootstrap support values (>85% on average) confirmed robust clades, with strains such as BR 14864, BR 14865, and BR 96 clustering closely, indicating shared genetic and adaptive traits. Notably, strains isolated from soybean nodules in Amazonian and Atlantic Forest soils (e.g., BR 14864, BR 14865) showed phylogenetic proximity to the commercial inoculant strain BR 96, suggesting possible re-isolation or contamination events. Phylogenetic incongruences between 16S rRNA and genomic trees highlighted the limitations of single-gene analyses and the impact of HGT on symbiosis-related genes (nod and nif). The dominance of *B. elkanii* among Brazilian strains aligned with its historical use in agriculture, while divergent strains such as BR 3287 suggested extensive HGT events, particularly in acidic and nutrient-poor soils.

Keywords: *Bradyrhizobium*, Genomics, Biological nitrogen fixation.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma das principais culturas agrícolas no Brasil, em termos econômicos, é a principal *commodity* do agronegócio brasileiro. O Brasil é o maior produtor e exportador de soja do mundo, a cultura contribui significativamente para a balança comercial do país (Hungria, 2023). O elevado desempenho produtivo está associado, em grande parte, a uma estratégia de inoculação bem estruturada, com o uso de cepas inoculantes altamente eficientes.

Em contraste, a produção de soja na Austrália é relativamente pequena quando comparada à de outros grandes países produtores, como o Brasil, os Estados Unidos e a Argentina. Entretanto, nos últimos anos, a produção australiana tem apresentado crescimento em razão da crescente demanda por alimentos e biocombustíveis. No país, o cultivo de soja é concentrado nos estados de Queensland e New South Wales, situados na região leste. A Austrália utiliza a cepa CB1809 desde 1960 para inocular essa leguminosa de grãos (Bullard et al., 2005).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) desempenha um papel crucial para a sustentabilidade da produção de soja, reduzindo a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos e minimizando impactos ambientais (Hungria e Mendes, 2015). Contudo, a eficiência desse processo depende diretamente da compatibilidade entre as cepas de rizóbios e os cultivares de soja utilizados (Hungria e Nogueira, 2022). Embora o Brasil e a Austrália adotem estratégias distintas de inoculação, ambos os países enfrentam desafios relacionados à adaptação e evolução das cepas de rizóbios nos respectivos solos agrícolas.

Os rizóbios nativos de ambos os países parecem incapazes de nodular a soja. No entanto, no Brasil, há relatos recentes de isolamento de rizóbios geneticamente distintos das cepas inoculantes a partir de nódulos de plantas inoculadas. Na Austrália, por outro lado, não há estudos genéticos recentes sobre a diversidade de rizóbios noduladores de soja em áreas de cultivo dessa leguminosa de grãos. Diante desse cenário, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética e a eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de soja provenientes das cepas brasileiras: BR 85; BR 86; BR 29; BR 96; BR 14863; BR 4864; BR 14865; BR 14866; BR13973 e BR 3287, e das cepas

australianas: CB1809; WSM4709 e WSM4804, além de investigar possíveis evidências de transferência horizontal da ilha de simbiose em rizóbios de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local do Desenvolvimento do Estudo

O presente estudo foi desenvolvido no *Centre for Rhizobium Studies* localizado na *Murdoch University*, no município de Perth/WA (Latitude: -32° 03' 59.47" S e Longitude: 115° 50' 6.29" E), Austrália Ocidental em parceria com a Embrapa Agrobiologia e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. As estirpes brasileiras utilizadas neste trabalho foram SEMIA 5080 (BR85), SEMIA 5079 (BR86), SEMIA 5019 (BR 29), BR 3287, EER09 (BR 14864), ERR06 (BR 14865), ERR148 (BR 14863), ERR94 (BR 14866), SEMIA587 (BR 96) e BR 13973 obtidas da coleção de culturas do CRB-JD. As estirpes australianas utilizadas foram CC789, CB1809, WSM4804 e WSM4799 obtidas do *Centre for Rhizobium Studies*. As bactérias foram isoladas a partir de nódulos coletados diretamente na cultura de soja em campos experimentais de ambos os países (Tabela 1).

Tabela 1 – Estirpes isoladas dos campos experimentais da Embrapa Agrobiologia e da *Murdoch University* utilizadas no estudo.

Código	Espécie	País	Origem	Hospedeiro de origem
BR85 (SEMIA5080)	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	Brasil	Planaltina/ DF	<i>Glycine max</i>
BR86 (SEMIA 5079)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Brasil	Planaltina/DF	<i>Glycine max</i>
BR3287	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Bom Jesus/PI	<i>Vigna unguiculata</i>
BR14864	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Boa Vista/RR	<i>Glycine max</i>
BR 14865 (ERR06)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Boa Vista/RR	<i>Glycine max</i>
BR14863 (ERR148)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Alto Alegre/RO	<i>Glycine max</i>
BR96 (SEMIA587)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Santa Rosa/RS	<i>Glycine max</i>
BR29 (SEMIA5019)	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> .	Brasil	Piraí/RJ	<i>Glycine max</i>
BR13973	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Seropédica/RJ	<i>Glycine max</i>
BR14866	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Boa Vista/RR	<i>Glycine max</i>
CB1809	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	África	South Africa	<i>Glycine max</i>
WSM4804	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Austrália	Kununurra/WA	<i>Glycine max</i>
WSM4799	<i>Bradyrhizobium diversitatis</i>	Austrália	Nambung/wa	<i>Glycine max</i>

Fonte: Autora (2024).

Quebra de Ampolas

O protocolo foi estabelecido pela Embrapa e foi baseado no trabalho de Muro e Luchi (1989). Realizou-se a quebra das ampolas de ambas as coleções e essas foram limpas com algodão embebido em etanol a 70%. Com auxílio de uma lima, as ampolas foram riscadas na altura do ponto médio do tampão de algodão. Em seguida, as ampolas foram envolvidas em um chumaço de algodão e, usando as duas mãos para firmar e pressionar com os dedos polegares, a quebra foi feita na altura do risco. O chumaço de algodão foi retirado com auxílio de uma pinça esterilizada por flambagem. Após esse processo com o uso de uma pipeta Pasteur estéril, foi adicionado meio de cultura líquido YMA (Yeast Extract Mannitol Agar) em quantidade suficiente para cobrir a amostra liofilizada, sem transbordar o conteúdo da ampola, dissolvendo a amostra com a pipeta. Foram transferidas uma a duas gotas da suspensão para placa de Petri contendo meio de cultivo, e foi feito o esgotamento com alça de platina. Ao final do procedimento, foi transferido o conteúdo restante da suspensão para tubo contendo meio de cultura líquido. As placas e tubos foram incubadas em estufa sob condições adequadas para o crescimento.

Crescimento das bactérias em placas de Petri

Primeiramente, o meio de cultura YMA foi preparado em garrafas de 500 ml, e teve o pH ajustado para cerca de 6,8 a 7,0. O meio preparado foi autoclavado a 121°C por cerca de 30 minutos para esterilização. Após a autoclavagem, o meio foi deixado para esfriar até cerca de 50°C e então foi vertido em placas de Petri estéreis, tomando cuidado para evitar a formação de bolhas dentro da câmara de fluxo contínuo. As bactérias que cresceram a partir da quebra das ampolas, foram estriadas na superfície do ágar usando uma alça bacteriológica esterilizada, visando o isolamento de colônias individuais. Em seguida, as placas inoculadas foram incubadas a 28°C em incubadora microbiológica por cerca de sete dias. Durante o período de incubação, as colônias foram monitoradas regularmente. Esse processo foi repetido por um número de vezes considerado seguro para que se obtivessem colônias de bactérias puras, destinadas à caracterização genética, bioquímica e à

comprovação da eficiência simbiótica.

Extração de DNA

As estirpes foram cultivadas em meio líquido YMA (Fred e Waksman, 1928; Vincent, 1970) com incubação a 28°C conforme o tempo de crescimento de cada isolado. As alíquotas de 1,5 ml da suspensão das células de cada isolado foram transferidas para microtubos de 2 ml e centrifugadas a 15000 x g. Descartou-se o sobrenadante e, com o precipitado, foi extraído o DNA genômico seguindo o protocolo do kit DNeasy Blood & Tissue da QIAGEN, para bactérias gram-negativas.

O protocolo para a extração de DNA iniciou-se com as células coletadas, com um máximo de 2×10^9 células, em um tubo de microcentrífuga, centrifugadas a 5000 x g (7500 rpm) por 10 minutos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 180 µl de Buffer ATL. Adicionou-se 20 µl de Proteinase K, misturou-se bem por vortex e incubou-se a 56°C até que o tecido estivesse completamente liso. Durante a incubação, utilizou-se vortex ocasionalmente para dispersar a amostra.

Para separar o DNA genômico livre de RNA, adicionou-se 4 µl de RNase A (100 mg/ml), misturou-se por vortex e incubou-se por 2 minutos à temperatura ambiente (15–25°C). Após esse procedimento, colocou-se as amostras no vortex por 15 segundos. Adicionou-se 200 µl de Buffer AL e misturou-se bem por vortex. Em seguida, adicionou-se 200 µl de etanol (96–100%) e misturou-se novamente por vortex. É essencial misturar imediatamente e completamente a amostra, o Buffer AL e o etanol para obter uma solução homogênea. O Buffer AL e o etanol foram pré-misturados e adicionados juntos para economizar tempo ao processar as amostras.

Pipetou-se a mistura, incluindo qualquer precipitado, na coluna de centrifugação DNeasy Mini colocada em um tubo de coleta de 2 ml. Centrifugou-se a ≥ 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto e descartou-se o fluxo e o tubo de coleta. Colocou-se a coluna DNeasy Mini em um novo tubo de coleta de 2 ml, adicionou-se 500 µl de Buffer AW1 e centrifugou-se por 1 minuto a ≥ 6000 x g (8000 rpm). Descartou-se novamente o fluxo e o tubo de coleta.

Colocou-se a coluna DNeasy Mini em um outro tubo de coleta de 2 ml,

adicionou-se 500 µl de Buffer AW2 e centrifugou-se por três minutos a 20.000 x g (14.000 rpm) para secar a membrana. Descartou-se o fluxo e o tubo de coleta. É crucial secar a membrana para evitar a interferência do etanol residual nas reações subsequentes. Após a centrifugação, removeu-se a coluna com cuidado para evitar contato com o fluxo de etanol.

Colocou-se a coluna DNeasy Mini em um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml e pipetou-se 200 µl de Buffer AE diretamente na membrana. Incubou-se à temperatura ambiente por um minuto e centrifugou-se por 1 minuto a ≥ 6000 x g (8000 rpm) para eluir. A eluição com 100 µl permite aumentar a concentração final de DNA, embora reduza o rendimento geral. Para maximizar o rendimento, repetiu-se a eluição conforme descrito. Usou-se um novo tubo de microcentrífuga para o segundo procedimento, a fim de combinar os eluídos, evitando a diluição. Após a secagem, o DNA foi reidratado com 100 µL de Rehydration Solution e armazenado em freezer a -20°C.

As amostras foram então suspensas em 400 µl de tampão de extração de DNA (mistura de 360 µl de tampão ATL e 40 µl de protease K; Kit DNeasy mini, Qiagen, Valencia, CA) e incubadas a 55°C durante a noite. Adicionalmente, 80 µl de protease K foram adicionados e a incubação prosseguiu por um total de 60 horas. Após a reação com 8 µl de RNase (100 mg/ml) por 2 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram completadas com 420 µl de ATL até um volume total de 900 µl e divididas em duas partes (450 µl cada). Cada parte foi misturada com 450 µl de tampão AL e 450 µl de etanol a 100%, e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram então carregadas em colunas de centrifugação DNeasy mini (Kit DNeasy mini, Qiagen, CA). A coluna foi lavada com tampão AW1 e a membrana da coluna foi seca com etanol a 80%, após o que o DNA genômico purificado foi diluído com 25 µl de água livre de nucleases.

Sequenciamento do Genoma

Para o sequenciamento foi utilizada a tecnologia MinION, desenvolvida pela Oxford Nanopore Technologies, e o procedimento foi conduzido de forma a garantir a obtenção de dados genômicos de alta qualidade e em tempo real (Jain et al., 2016). Inicialmente, realizou-se a extração do DNA/RNA da amostra

biológica de interesse, seguida pela preparação da biblioteca. A seguir, adaptadores específicos foram ligados às extremidades dos fragmentos, permitindo que estes fossem reconhecidos e lidos pelos nanopores durante o processo de sequenciamento.

Com a biblioteca preparada, a amostra foi carregada em uma flow cell contendo milhares de nanopores, que são proteínas inseridas em uma membrana capaz de formar canais que permitem a passagem de moléculas de DNA ou RNA. Durante o sequenciamento, uma corrente elétrica foi aplicada através da membrana, e à medida que o DNA ou RNA passou por um nanoporo, ocorreram variações características no fluxo de íons, resultando em alterações na corrente elétrica. Essas mudanças são específicas para cada uma das bases nucleotídicas (A, T, C, G no caso do DNA, ou A, U, C, G no caso do RNA), permitindo a identificação das sequências à medida que a molécula atravessa o nanoporo.

Os sinais elétricos gerados durante a passagem das moléculas pelos nanopores foram registrados pelo MinION e convertidos em sequências de bases nucleotídicas por meio de algoritmos bioinformáticos avançados. Os dados de sequenciamento gerados foram armazenados em arquivos no formato FASTQ, contendo as sequências de nucleotídeos e suas respectivas qualidades.

Finalmente, os dados de sequenciamento foram analisados para diversas finalidades, como a identificação de variantes genéticas ou a montagem de genomas completos. As leituras longas proporcionadas pelo MinION facilitaram a montagem de genomas mais complexos e a detecção de rearranjos estruturais, características frequentemente difíceis de identificar com outras tecnologias de sequenciamento. O MinION também permitiu o monitoramento em tempo real do progresso do sequenciamento, proporcionando flexibilidade e controle adicional sobre o processo experimental.

Coleta de Dados Genômicos

A partir da extração de DNA, as sequências genômicas utilizadas neste estudo foram introduzidas na plataforma PATRIC (*Pathosystems Resource Integration Center*, <https://www.patricbrc.org/>) (Wattam et al., 2017). Os genomas completos de espécies bacterianas do gênero *Bradyrhizobium* e seus

respectivos genes anotados foram selecionados com base em sua relevância para a investigação de transferência horizontal de genes (THG). As espécies-alvo incluíram representantes de diferentes linhagens taxonômicas.

Modelo Evolutivo

Para determinar o modelo que melhor descreve os padrões de substituição nucleotídica e construir as árvores filogenéticas das sequências de 16S rRNA, nodA, nodB, nodC, nodD e da análise concatenada, foi realizada uma análise comparativa de 24 modelos evolutivos distintos. Essa análise foi conduzida utilizando o software MEGA11 (Tamura et al., 2021), com base nos critérios estatísticos de Informação Bayesiana (BIC) e de Informação de Akaike corrigido (AICc). O BIC avaliou a adequação do modelo penalizando a complexidade excessiva, favorecendo modelos mais simples que ainda explicam bem os dados, enquanto o AICc é semelhante ao AIC, mas ajustado para conjuntos de dados com amostras limitadas, equilibrando o ajuste do modelo e a parcimônia.

Análises Filogenéticas

Os alinhamentos foram realizados com a ferramenta MUSCLE dentro do programa MEGA 11 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) e através da plataforma de bioinformática PATRIC (*Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*), que oferece dados genômicos e ferramentas analíticas para estudar bactérias e vírus. A confiabilidade do agrupamento em clados formados nas árvores foi calculada com 500 replicações bootstrap para avaliar a robustez da árvore (Felsenstein, 1985; Swofford, 1991), garantindo o suporte estatístico para os dados obtidos.

Foi gerada uma árvore filogenômica e árvores filogenéticas para os genes 16S rRNA, genes de nodulação nodA, nodB, nodC e nodD, assim como uma árvore concatenada dos genes de nodulação, utilizando as sequências obtidas neste estudo juntamente com as sequências das estirpes de referência obtidas na plataforma PATRIC. As distâncias foram calculadas de acordo com o modelo de Tamura de três parâmetros (Tamura, 1992) e as árvores filogenéticas foram inferidas usando o método de vizinhança (Saitou e Nei, 1987).

Os resultados das análises foram interpretados em conjunto para verificar a consistência com o modelo de transferência horizontal de genes. Evidências robustas de THG foram consideradas em casos em que as árvores filogenéticas mostraram incongruência clara entre a filogenia da espécie e do gene.

Análises Genômicas

Os dados da sequência do genoma foram carregados no Type (Strain) *Genome Server* (TYGS), uma plataforma de bioinformática gratuita disponível em (<https://tygs.dsmz.de>), para uma análise taxonômica baseada em genoma completo (Meier-Kolthoff et al., 2022).

A análise também fez uso de atualizações e recursos metodológicos introduzidos recentemente. As informações sobre nomenclatura, sinonímia e literatura taxonômica associadas foram fornecidas pelo banco de dados irmão do TYGS, a Lista de Nomes Procarióticos com Posição na Nomenclatura (LPSN, disponível em <https://lpsn.dsmz.de>) (Parte et al., 2020). Os resultados foram fornecidos pelo TYGS em 15 de janeiro de 2025.

A análise do TYGS foi subdividida nas seguintes etapas: (i) determinação de cepas de tipo intimamente relacionadas. A determinação dos genomas de cepas de tipo mais próximas foi feita de duas maneiras complementares: primeiro, todos os genomas dos usuários foram comparados com todos os genomas de cepas de tipo disponíveis no banco de dados TYGS por meio do algoritmo MASH, uma aproximação rápida de parentesco intergenômico, e as dez cepas de tipo com as menores distâncias MASH foram escolhidas por genoma de usuário.

Segundo, um conjunto adicional de dez cepas de tipo intimamente relacionadas foi determinado por meio das sequências do gene 16S rDNA. Elas foram extraídas dos genomas dos usuários usando RNAmmer [4] e cada sequência foi subsequentemente comparada por BLAST [5] contra a sequência do gene 16S rDNA de cada uma das 22195 cepas de tipo atualmente disponíveis no banco de dados TYGS.

Esse procedimento foi usado como um proxy para encontrar as 50 melhores cepas de tipo correspondentes (de acordo com o bitscore) para cada genoma de usuário e, posteriormente, calcular distâncias precisas usando a

abordagem *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) sob o algoritmo 'cobertura' e a fórmula de distância d5.

Essas distâncias foram finalmente usadas para determinar os 10 genomas de cepas de tipo mais próximos para cada um dos genomas do usuário. Para a inferência filogenômica, todas as comparações pareadas entre o conjunto de genomas foram conduzidas usando GBDP, e distâncias intergenômicas precisas foram inferidas sob o algoritmo “trimming” e a fórmula de distância d5. Cem réplicas de distância foram calculadas para cada comparação. Os valores de dDDH e os intervalos de confiança foram calculados usando as configurações recomendadas do GGDC 4.0.

As distâncias intergenômicas resultantes foram usadas para inferir uma árvore de evolução mínima balanceada com suporte de ramificação via FASTME, incluindo pós-processamento SPR. O suporte de ramificação foi inferido a partir de 100 réplicas pseudo-bootstrap. As árvores foram enraizadas no ponto médio e visualizadas com PhyD3.

O agrupamento de espécies baseado em tipo, usando um raio de dDDH de 70% ao redor de cada uma das linhagens do tipo, foi feito conforme descrito anteriormente. O agrupamento de subespécies foi realizado usando um limite de dDDH de 79%, conforme proposto anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Árvores filogenéticas - Modelo Evolutivo

Os modelos com as menores pontuações BIC (Critério de Informação Bayesiano) são considerados aqueles que melhor descrevem o padrão de substituição. Para cada modelo, foram avaliados o valor AICc (Critério de Informação de Akaike, corrigido), o valor de Máxima Verossimilhança (lnL) e o número de parâmetros (incluindo comprimentos de ramificação) (Nei, 2000). A não uniformidade das taxas evolutivas entre os sítios pode ser modelada usando uma distribuição gama discreta (+G) com cinco categorias de taxas e assumindo que uma fração dos sítios é evolutivamente invariável (+I). Sempre que aplicável, estimativas do parâmetro de forma gama e/ou da fração estimada de sítios invariáveis são apresentadas.

Valores assumidos ou estimados de viés de transição/transversão (R) também são mostrados para cada modelo. Eles são seguidos por frequências de nucleotídeos (f) e taxas de substituição de bases (r) para cada par de nucleotídeos. Valores relativos de r instantâneo devem ser considerados ao avaliá-los. Para simplificar, a soma dos valores de r é igual a 1 para cada modelo. Para estimar os valores de ML, uma topologia de árvore foi automaticamente computada. Esta análise envolveu 36 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1º + 2º + 3º + não codificante. Havia um total de 1488 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA11 (Tamura et al., 2021).

Os modelos evolutivos e seus critérios estatísticos estão na Tabela 2. O modelo selecionado para as árvores filogenéticas foi o T92+G+I (em azul), por apresentar os menores valores de BIC (9059.355) e AICc (8410.977). Ele assume taxas de substituição não uniformes, incorporando uma distribuição gama discreta de cinco categorias (+G; estimativa = 2.26) e uma proporção de sítios invariáveis (+I = 0.31).

Tabela 2 – Modelo evolutivo de acordo com a substituição nucleotídica e seus critérios estatísticos, com ajustes de máxima verossimilhança com 24 modelos diferentes de substituição nucleotídica.

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92+G+I	73	9059.355	8410.977	-4132.387	0.31	2.26	2.23	0.223	0.223	0.277	0.277	0.034	0.043	0.192	0.034	0.192	0.043	0.034	0.154	0.043	0.154	0.034	0.043
T92+G	72	9063.694	8424.195	-4139.999	n/a	2.12	1.36	0.223	0.223	0.277	0.277	0.047	0.058	0.161	0.047	0.161	0.058	0.047	0.129	0.058	0.129	0.047	0.058
T92+I	72	9065.573	8426.074	-4140.938	0.34	n/a	2.03	0.223	0.223	0.277	0.277	0.037	0.045	0.186	0.037	0.186	0.045	0.037	0.150	0.045	0.150	0.037	0.045
K2+G+I	72	9074.363	8434.864	-4145.333	0.32	2.26	2.24	0.250	0.250	0.250	0.250	0.039	0.039	0.173	0.039	0.173	0.039	0.039	0.173	0.039	0.173	0.039	0.039
K2+G	71	9082.912	8452.292	-4155.050	n/a	2.17	1.34	0.250	0.250	0.250	0.250	0.053	0.053	0.143	0.053	0.143	0.053	0.053	0.143	0.053	0.143	0.053	0.053
T92	71	9084.558	8453.938	-4155.873	n/a	n/a	1.20	0.223	0.223	0.277	0.277	0.050	0.063	0.152	0.050	0.152	0.063	0.050	0.122	0.063	0.122	0.050	0.063
K2+I	71	9086.192	8455.572	-4156.690	0.34	n/a	1.95	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.165	0.042	0.165	0.042	0.042	0.165	0.042	0.165	0.042	0.042
JC+G+I	71	9086.414	8455.794	-4156.801	0.24	0.21	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
HKY+G+I	75	9096.955	8430.819	-4140.303	0.30	2.26	2.24	0.242	0.204	0.243	0.311	0.032	0.038	0.214	0.038	0.168	0.048	0.038	0.141	0.048	0.167	0.032	0.038
TN93+G+I	76	9101.144	8426.129	-4136.955	0.30	2.26	2.20	0.242	0.204	0.243	0.311	0.031	0.037	0.150	0.037	0.232	0.048	0.037	0.195	0.048	0.116	0.031	0.037
K2	70	9103.438	8481.697	-4170.755	n/a	n/a	1.19	0.250	0.250	0.250	0.250	0.057	0.057	0.136	0.057	0.136	0.057	0.057	0.136	0.057	0.136	0.057	0.057
HKY+G	74	9104.254	8446.997	-4149.394	n/a	2.17	1.39	0.242	0.204	0.243	0.311	0.043	0.051	0.180	0.051	0.141	0.065	0.051	0.118	0.065	0.140	0.043	0.051
HKY+I	74	9105.400	8448.143	-4149.967	0.33	n/a	2.06	0.242	0.204	0.243	0.311	0.034	0.040	0.209	0.040	0.163	0.051	0.040	0.137	0.051	0.162	0.034	0.040
TN93+G	75	9108.297	8442.161	-4145.974	n/a	2.08	1.38	0.242	0.204	0.243	0.311	0.042	0.051	0.143	0.050	0.179	0.065	0.050	0.150	0.065	0.111	0.042	0.051
TN93+I	75	9109.783	8443.647	-4146.716	0.33	n/a	1.99	0.242	0.204	0.243	0.311	0.034	0.040	0.149	0.040	0.220	0.051	0.040	0.185	0.051	0.116	0.034	0.040
HKY	73	9124.659	8476.281	-4165.039	n/a	n/a	1.23	0.242	0.204	0.243	0.311	0.046	0.055	0.171	0.054	0.134	0.070	0.054	0.112	0.070	0.133	0.046	0.055
GTR+G+I	79	9128.075	8426.424	-4134.093	0.32	2.26	2.41	0.242	0.204	0.243	0.311	0.025	0.026	0.155	0.029	0.240	0.029	0.026	0.201	0.072	0.121	0.019	0.056
TN93	74	9129.714	8472.457	-4162.124	n/a	n/a	1.21	0.242	0.204	0.243	0.311	0.046	0.055	0.140	0.054	0.164	0.070	0.054	0.137	0.070	0.109	0.046	0.055
GTR+I	78	9138.073	8445.301	-4144.535	0.34	n/a	2.17	0.242	0.204	0.243	0.311	0.030	0.030	0.155	0.036	0.227	0.030	0.030	0.190	0.074	0.121	0.020	0.058
GTR+G	78	9138.728	8445.956	-4144.862	n/a	2.06	1.39	0.242	0.204	0.243	0.311	0.040	0.051	0.144	0.047	0.180	0.058	0.051	0.151	0.073	0.112	0.038	0.057
JC+G	70	9139.914	8518.174	-4188.994	n/a	2.23	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+I	70	9142.395	8520.655	-4190.234	0.38	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC	69	9157.071	8544.210	-4203.015	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR	77	9160.640	8476.747	-4161.261	n/a	n/a	1.21	0.242	0.204	0.243	0.311	0.044	0.056	0.140	0.052	0.164	0.066	0.056	0.138	0.074	0.109	0.043	0.058

Árvore filogenética com base no gene 16S rRNA

Ao examinar a árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA (Figura 4), é possível observar que os valores de bootstrap na árvore são variáveis, desde suportes baixos (bootstrap=16), em agrupamentos incertos, até valores muito altos (bootstrap=99) em agrupamentos bem definidos. Essa variação indica diferentes níveis de confiabilidade nas relações filogenéticas (Hesterberg, 2011).

A cepa BR 3287 está intimamente relacionada com *B. centrosematis* LMG 29515 (bootstrap =98), sugerindo que essas cepas apresentam fundo cromossômico similar, o que pode ser explicado por dois cenários principais: (1) a existência de um ancestral comum recente ou (2) a ocorrência de eventos de THG entre elas. Esse tipo de evento é frequentemente associado à aquisição de genes que conferem vantagens adaptativas, como a capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio em diferentes leguminosas (Rogel et al., 2011).

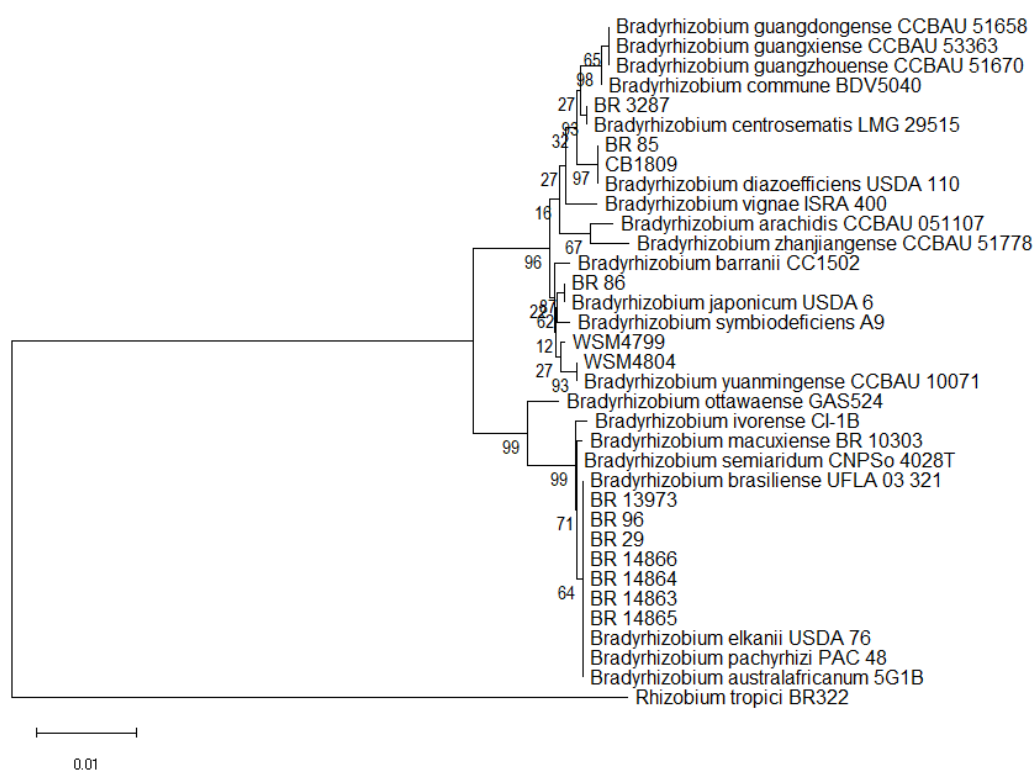


Figura 4: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene 16S rRNA das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR14866, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo.

De forma similar, as cepas CB1809 e BR 85 mostram uma relação próxima com a espécie-tipo *B. diazoefficiens* USDA 110, com suporte estatístico robusto (bootstrap = 97). A cepa CB1809, em particular, já é amplamente reconhecida como pertencente a essa espécie, o que corrobora sua alta similaridade genética. Estudos anteriores demonstraram que *B. diazoefficiens* é altamente conservado em termos genômicos, mas também apresenta variações atribuídas a eventos de THG (Delamuta et al., 2013).

Indícios de THG são observáveis em outras partes da árvore. Por exemplo, o agrupamento de BR 86 com *B. japonicum* USDA 6 e, em seguida, sua proximidade com cepas relacionadas a *B. Barrani* CC1502 pode refletir um histórico de troca gênica em regiões sobrepostas. Da mesma forma, o *cluster* formado por BR 96, BR 29 e BR 13973, que se conecta a *B. elkanii*, *B. pachyrhizi* e *B. brasiliense*, apesar do suporte estatístico moderado (bootstrap = 71), apresenta afinidades típicas de linhagens tropicais comumente associadas à simbiose com soja em solos brasileiros, o que aponta para possíveis eventos de recombinação gênica. Segundo de Souza Moreira et al. (2010), a ocorrência de recombinação entre bactérias desse gênero é comum, principalmente em regiões genômicas associadas à simbiose com plantas leguminosas, como os genes do sistema de fixação de nitrogênio. Além disso, sabe-se que a THG pode ocorrer entre diferentes espécies, incluindo genes ribossomais, tradicionalmente considerados altamente conservados e amplamente utilizados como ferramenta na taxonomia bacteriana (Delamuta et al., 2019).

Já as cepas BR 14863, BR 14864, BR 14865 e BR 14866 agrupam-se de forma mais consistente com *B. elkanii*, evidenciando alta similaridade genética e indicando que pertencem a um grupo específico, possivelmente adaptado a condições locais específicas. De acordo com Hungria et al. (2015), a THG é um fenômeno comum em bactérias, especialmente em gêneros como *Bradyrhizobium*, que frequentemente interagem com plantas hospedeiras e outros organismos do solo. Essa plasticidade genética pode alterar o conteúdo genômico de cepas específicas, influenciando filogenias baseadas em genomas completos, sem necessariamente impactar o gene 16S rRNA. Estudos recentes sobre *Bradyrhizobium* destacam a ocorrência de transferência horizontal em genes relacionados à simbiose, como aqueles associados à nodulação e à

fixação de nitrogênio (Hungria et al., 2015).

Por outro lado, as cepas WSM4799 e WSM4804 mostram uma relação com *B. yuanmingense* CCBAU 10071 (bootstrap = 93), sugerindo que elas estão mais próximas de linhagens asiáticas, provavelmente adaptadas a diferentes hospedeiros e condições ambientais. Ao comparar esses resultados com a árvore genômica é possível observar uma divergência discreta para a cepa WSM4799, que se correlaciona a *B. diversitatis* CNPSO 3448 na árvore genômica.

Esse padrão pode ser explicado, segundo Menna et al. (2009), pelas diferenças nas árvores filogenéticas baseadas no genoma completo e no gene 16S rRNA em *Bradyrhizobium*, as quais podem ocorrer devido à baixa resolução do gene 16S rRNA para distinguir espécies próximas. Embora esse gene seja conservado, apresenta limitações na discriminação de espécies de *Bradyrhizobium*, sugerindo que análises de múltiplos genes ou do genoma completo fornecem maior precisão filogenética. Além do mais, Whitman (2015), enfatiza que árvores baseadas no gene 16S rRNA são limitadas por seu pequeno tamanho e pela seleção de regiões específicas, enquanto árvores genômicas podem ser influenciadas pela escolha de genes ortólogos, métodos de montagem e qualidade dos dados de sequenciamento.

Árvore filogenética com base no gene nodA

A árvore filogenética baseada no gene marcador *nodA* (Figura 5) apresenta suporte de bootstrap alto em várias ramificações, como no agrupamento de BR 86, CB1809 e BR 85 relacionado à espécie-tipo *B. ottawaense* S15A-Bj (bootstrap=100).

De forma semelhante, a cepa WSM4804 encontra-se em um clado robusto com *B. yuanmingense* CCBAU 10071 (bootstrap=100), assim como a cepa BR 3287 forma um clado consistente com *B. centrosematis* LMG 29515 (bootstrap = 94), indicando alta relação filogenética. Esse agrupamento reforça a proximidade entre as cepas e sugere que compartilham características genéticas possivelmente relacionadas à adaptação a condições ambientais ou a hospedeiros específicos.

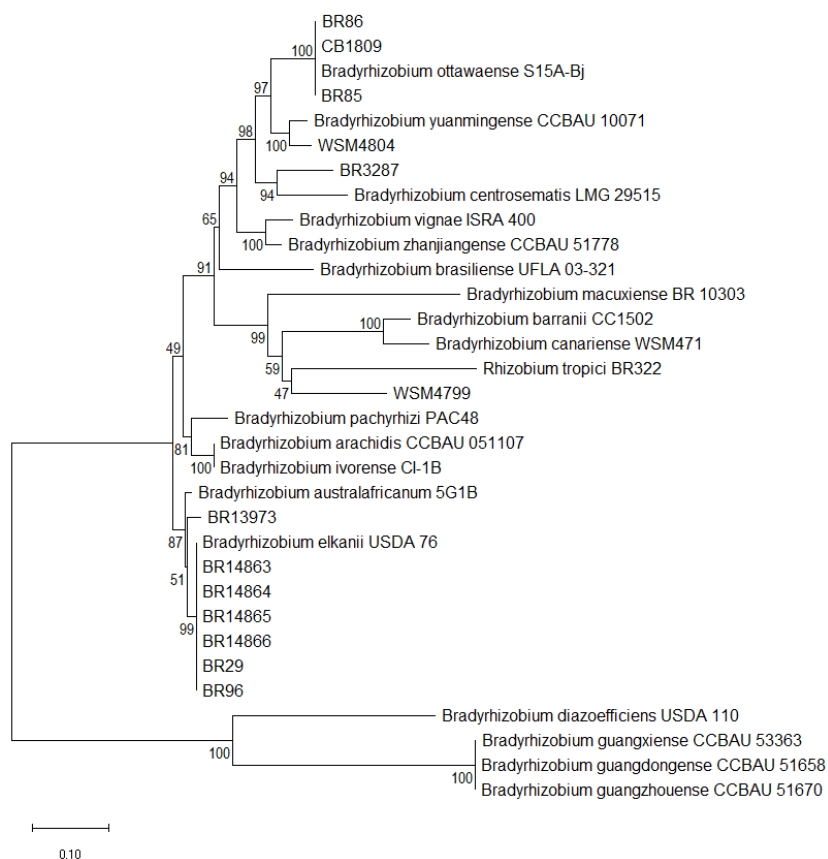


Figura 5: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene *nodA* das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR14866, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo.

De acordo com Oldroyd e Downie (2008), genes relacionados à nodulação frequentemente estão associados à THG, o que pode explicar a similaridade observada entre cepas de diferentes origens geográficas ou ecológicas. Além do mais, Hungria et al. (2006), destacam a elevada plasticidade genética em *Bradyrhizobium*, com eventos de THG simbióticos e adaptação a diferentes hospedeiros e condições ambientais. Esses processos são impulsionados pela coevolução com plantas, especialmente a soja, refletindo forte pressão seletiva para uma adaptação simbiótica eficiente.

Por outro lado, cepas como WSM4799 e *Rhizobium tropici* BR 322 formam um grupo separado, com baixo suporte estatístico (bootstrap = 47), que evidenciam uma relação evolutiva mais distante em relação aos demais grupos de *Bradyrhizobium*. Essa separação indica pressões seletivas divergentes ou

uma história evolutiva distinta, possivelmente associada a hospedeiros alternativos. Os genes *nod* atuam como moléculas sinalizadoras cruciais para o estabelecimento da simbiose planta-bactéria e apresentam uma estrutura básica conservada, embora incluam variações que refletem adaptações às condições ambientais e às plantas hospedeiras (Perret et al., 2000). Dessa forma, os padrões filogenéticos observados ressaltam o papel do gene *nodA* tanto como marcador filogenético quanto como indicativo de adaptações ecológicas e simbióticas.

O clado formado por BR 14863 14864, BR 14865 e BR 14866 conecta-se a *B. elkanii* USDA 76 com suporte elevado (bootstrap = 99) e à cepa BR 13973 com suporte moderado (bootstrap = 51). Este padrão sugere a existência de uma possível herança genética compartilhada de um ancestral comum, possivelmente associada à nodulação de leguminosas específicas em diferentes nichos ecológicos. Observa-se ainda proximidade com *B. australafricanum* 5G1B, amplamente estudado por sua diversidade genética, o que levanta questionamentos sobre a origem e o papel adaptativo desses genes simbióticos (Menna e Hungria, 2011).

A cepa BR 13973, apesar de próxima ao *cluster* formado por BR 14863 14864, BR 14865, BR 14866 e *B. elkanii* USDA 76, apresenta-se em um clado separado, sugerindo que possa representar uma simbiose distinta. Essa divergência pode ser atribuída a eventos de THG envolvendo genes *nodA*, mecanismo fundamental na adaptação simbiótica de rizóbios (Remigi et al., 2016). Esses genes, envolvidos na produção dos fatores Nod e na fixação biológica de nitrogênio, são frequentemente localizados em ilhas genômicas simbióticas, as quais podem ser transferidas lateralmente entre diferentes espécies de rizóbios ou até mesmo entre outros gêneros bacterianos (Sullivan et al., 1995; Young et al., 2006). Como consequência, os genes simbióticos tendem a apresentar filogenias distintas daquelas do genoma central de seus hospedeiros bacterianos (Sullivan et al., 1995; Sprent e Platzmann, 2001).

Árvore filogenética com base no gene nodB

Ao observar o dendrograma com base no gene *nodB* (Figura 6), nota-se que as cepas BR 14865, BR 14864, BR 14863, BR 14866, BR 96 e BR 29

formam um clado com *B. elkanii* UDSA 76, evidenciando a relação evolutiva estreita existente entre elas. Esse fato pode ser explicado por que algumas dessas cepas são indicadas como inoculantes no Brasil (BR 96 e BR 29), por serem altamente disseminadas no território brasileiro, o que reforça a hipótese de que possivelmente essas cepas tenham trocado informações gênicas no solo por meio das ilhas de simbiose. O suporte de bootstrap de 99 sugere uma relação filogenética robusta.

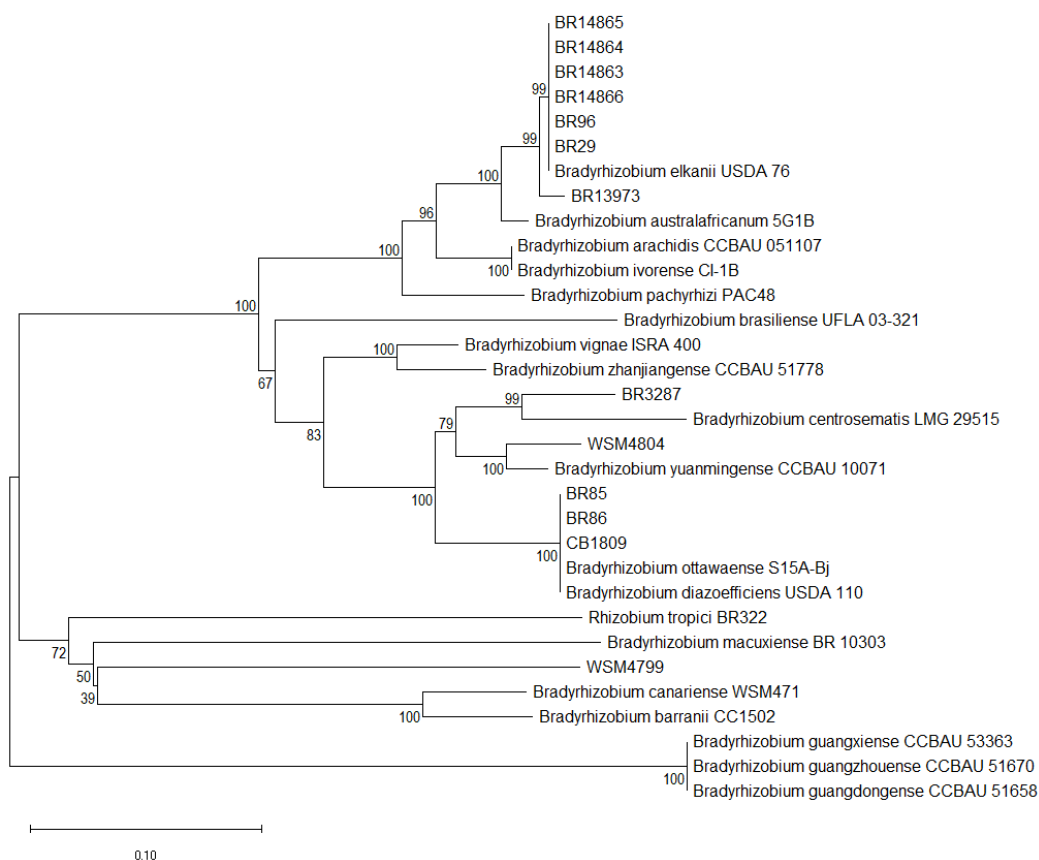


Figura 6: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene *nodB* das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo.

Um ponto de incongruência nessa árvore é a posição relativamente isolada da cepa BR 13973, que, ainda assim, aparece fortemente associada ao clado formado pelas cepas mencionadas anteriormente (BR 14865, BR 14864,

BR 14863, BR 14866, BR 96, BR 29 e *B. elkanii* UDSA 76). A alta robustez do suporte estatístico (bootstrap = 99) e a proximidade com essas cepas indicam que BR 13973 também compartilha uma relação filogenética muito estreita com elas. De forma similar, a cepa WSM4799 encontra-se relativamente isolada em um clado que se liga a *B. macuxiense* BR 10303. Isso sugere que, embora essas cepas possam ter se diversificado em suas características, elas ainda mantêm uma base genética comum, possivelmente devido à ocorrência de transferência horizontal de genes (THG). Esse agrupamento também indica que essas cepas podem integrar um grupo específico de *Bradyrhizobium* adaptado a determinado nicho ecológico.

O gene *nodB* é crucial para a nodulação de leguminosas e pode ser adquirido de outras espécies de *Bradyrhizobium* ou até mesmo de outras bactérias do solo. A forte similaridade entre essas cepas e o fato de estarem agrupadas de forma tão consistente indicam que a THG pode ter desempenhado um papel importante na formação desse clado. As cepas podem ter trocado genes de nodulação para se adaptarem a novos hospedeiros, como diferentes cultivares de soja ou outras leguminosas. Estudos como os de Hungria et al. (2015) e Andrews et al. (2018) enfatizam que a troca de material genético, incluindo genes *nodA* e *nodB*, é facilitada pela convivência das cepas em ambientes agrícolas e por sua capacidade de rápida adaptação a novos nichos ecológicos.

A cepa WSM4804 agrupa-se com *B. yuanmingense* CCBAU 51778 com bootstrap máximo, reforçando a forte proximidade genética entre essas estirpes. Em seguida as cepas BR 85, BR 86 e CB1809 aparecem agrupadas de forma muito próxima na árvore, formando um clado altamente robusto com suporte estatístico de 100. Essas cepas relacionam-se com *B. diazoefficiens* USDA 110, *B. japonicum* USDA 6 e *B. ottawaense* S15A-Bj, formando um agrupamento que indica uma estreita relação filogenética. A elevada similaridade entre essas cepas pode refletir um processo de evolução conservativa, particularmente do gene *nodB*, que está diretamente envolvido na nodulação de leguminosas. O suporte estatístico de 100 para as relações entre essas cepas e as espécies de referência reforça a confiabilidade dessa associação. Além disso, a posição de *B. diazoefficiens* USDA 110 e *B. japonicum* USDA 6, bem como a proximidade

de CB1809 com *B. ottawaense*, sugere que essas cepas compartilham não apenas similaridade genética, mas também mecanismos moleculares conservados associados à nodulação de leguminosas, característica essencial para a adaptação ao ambiente agrícola.

Árvore filogenética com base no gene *nodC*

A árvore filogenética baseada no gene *nodC* (Figura 7), apresenta comportamento semelhante às árvores obtidas para os genes *nodA* e *nodB*. Observa-se que as cepas BR 14864, BR 96 e BR 14865 formam um clado, com bootstrap moderado (75), o qual se liga a outro clado formado por *B. elkanii* USDA 76, BR 14863 e BR 14866, com bootstrap de 89.

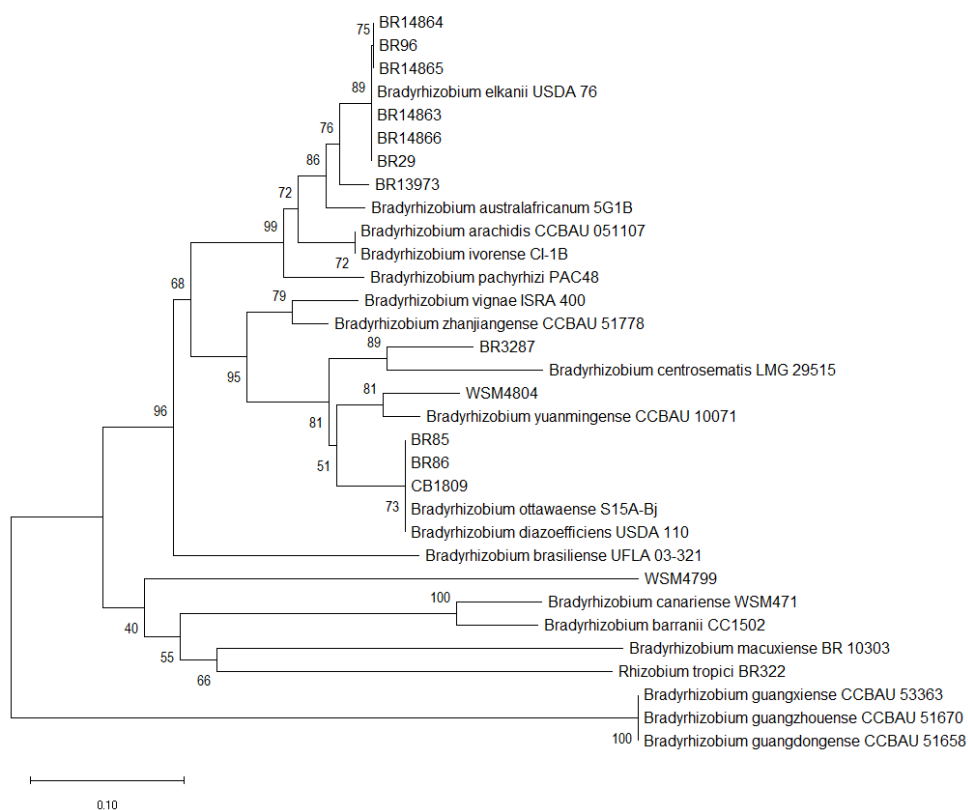


Figura 7: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas com base no gene *nodC* das cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo.

Logo abaixo a cepa BR 13973, mais uma vez, se apresenta em um clado solitário que se agrupa de forma consistente com os dois clados formados pelas cepas citadas anteriormente, apresentando um suporte bootstrap de 76, o que reforça sua proximidade genética com essas estirpes. Repetindo esse padrão, a cepa WSM4799 aparece em um clado isolado que se liga a outros clados com bootstrap baixo.

Estudos como os de Remigi et al. (2016) destacam que a conservação de genes simbióticos em clados específicos pode refletir pressões seletivas adaptativas, especialmente em ambientes onde hospedeiros comuns são predominantes.

Mais uma vez, a cepa BR 3287 aparece associada a *B. centroseomatis* LMG 29515 (bootstrap = 89). De forma similar, a cepa WSM4804 se associa a *B. yuanmingense* CCBAU 51778, formando um clado com suporte moderado (bootstrap = 81). Essa associação consistente ao longo de diferentes árvores filogenéticas, incluindo 16S rRNA, nodA e nodB, corrobora sua classificação como estreitamente relacionada a essas espécies-tipo. Esse padrão sugere que BR 3287 e WSM4804 compartilham características genômicas centrais e fatores simbióticos conservados, potencialmente em decorrência de um histórico evolutivo comum ou de processos de adaptação a hospedeiros semelhantes. Estudos prévios, como os de Moulin et al. (2004), também observaram relações genéticas próximas entre rizóbios adaptados a leguminosas específicas, reforçando a importância dos genes simbióticos para essas associações.

Relações evolutivas com base no gene nodD

O dendrograma representativo das relações evolutivas com base no gene marcador nodD (Figura 8), novamente se relaciona as cepas CB1809, BR 86 e BR 85 às espécies-tipo *B. japonicum* USDA 6, *B. ottawaense* S15A-Bj e *B. diazoefficiens* USDA 110, com suporte estatístico máximo (bootstrap = 100), indicando uma relação filogenética consistente. Esses resultados corroboram estudos prévios, como os de Kaneko et al. (2002) e Delamuta et al. (2013), que destacam a proximidade genética entre cepas simbióticas de soja e as espécies modelo *B. japonicum* e *B. diazoefficiens*, ambas amplamente reconhecidas por

sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas.

A cepa WSM4804, por sua vez, mantém o padrão observado em árvores filogenéticas anteriores, agrupando-se com *B. yuanmingense* CCBAU 10071, com suporte estatístico máximo (bootstrap = 100). De forma similar, a cepa WSM4799, repete o padrão observado nas árvores anteriores, encontrando-se em um clado isolado que se liga, com suporte estatístico de 72, ao clado de BR 3287 e *B. centrosematis* LMG 29515 (bootstrap = 100). Este agrupamento reflete a ampla distribuição e a adaptabilidade simbiótica de *B. yuanmingense* CCBAU 10071, com capacidade de nodular múltiplas espécies de leguminosas, conforme destacado por Mwenda et al. (2018).

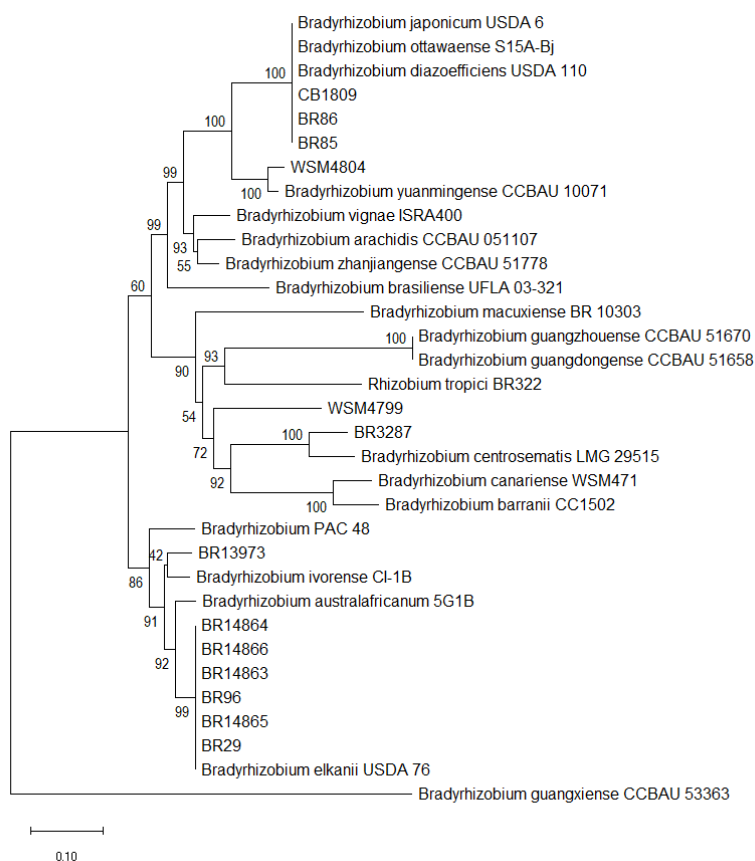


Figura 8: Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas de diferentes com base no gene *nodD* para as cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo.

Por outro lado, a cepa BR 13973, apesar do suporte baixo (bootstrap = 42), encontra-se em um clado junto com *B. ivorensis* CL-1B. Esse clado, por sua vez, liga-se a *B. australafricanum* 5G1B de forma robusta (bootstrap = 91), assim como se conecta, com bootstrap elevado (92), ao clado formado pelas cepas BR 14864, BR 14866, BR 14863, BR 96, BR 14865, BR 29 e *B. elkanii* USDA 76, clado consistente em outras árvores filogenéticas, com suporte elevado (bootstrap = 98). Estudos como os de Menna et al. (2009) evidenciam que *B. elkanii* frequentemente apresenta genomas altamente dinâmicos, com maior propensão a eventos de transferência horizontal de genes simbióticos.

Os genes simbióticos, como *nod* e *nif*, estão frequentemente localizados em ilhas genômicas, o que facilita sua transferência entre diferentes espécies ou até mesmo entre gêneros bacterianos (Sullivan et al., 1995; Cummings et al., 2009). Essa plasticidade genética resulta em filogenias incongruentes entre os genes simbióticos e o genoma central dos rizóbios, um fenômeno amplamente documentado por estudos de Sprent e Platzmann, 2001 e Andrews e Andrews (2017). Em ambientes tropicais, como os solos brasileiros e australianos, a diversidade de hospedeiros e as condições ambientais favorecem tais eventos, permitindo que os rizóbios adquiram genes que ampliem sua capacidade simbiótica (Hungria et al., 2015).

Árvore filogenética a partir da concatenação dos genes nodABCD

A partir da árvore filogenética apresentada (Figura 9), construída com a concatenação dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, e *nodD*, é possível observar que as cepas BR 29, BR 14866, BR 14863 e BR 96 estão agrupadas com *B. elkanii* USDA 76 formando um clado com suporte estatístico moderado (bootstrap = 81).

Trabalhos como os de Shiro et al. (2013) já destacaram a plasticidade genômica de *B. elkanii*, favorecendo sua adaptação a diversos hospedeiros e nichos ecológicos. A cepa BR 13973 liga-se a esse clado com suporte bootstrap de 94, ao mesmo tempo em que também se agrupa com *B. australafricanum* 5G1B (suporte = 92), sugerindo uma relação próxima. *B. australafricanum* é conhecido por sua capacidade de adaptação a solos ácidos, conforme relatado por Lemaire et al. (2015), destacando sua importância em regiões tropicais.

A cepa BR 3287 aparece mais uma vez associada a *B. centrosematis*

LMG 29515, dessa vez com suporte estatístico elevado (bootstrap = 94), sugerindo uma relação filogenética consistente. Sugere proximidade filogenética com a espécie-tipo *B. centrosematis* LMG 29515, visto que essa espécie nodula originalmente *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*. De acordo com Hassen et al. (2023), *B. centrosematis* foi identificado como um simbiote eficiente em solos tropicais e subtropicais, frequentemente associado a essas *leguminosas*.

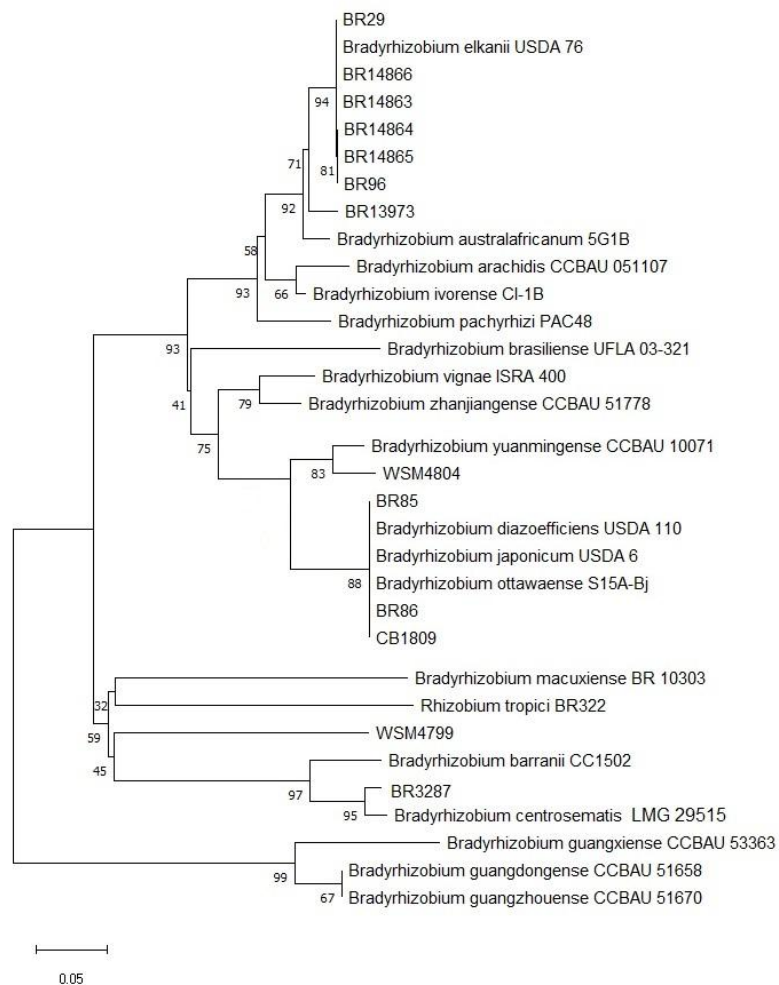


Figura 9: Árvore filogenética representando as relações evolutivas de construída a partir da concatenação dos genes nodA, nodB, nodC e nodD para as cepas de *Bradyrhizobium*: BR85, BR86, BR3287, BR14863, BR14864, BR14865, BR96, BR29, BR13973, CB1809, WSM 4799 e WSM4804 e espécies-tipo.

Já as cepas BR 85, BR 86 e CB1809 encontram-se alinhadas a *B. diazoefficiens* USDA 110 e *B. japonicum* USDA 6, com suporte elevado

(bootstrap = 88). Esse resultado corrobora os estudos de Kaneko et al. (2002), que descrevem *B. japonicum* e *B. diazoefficiens* como espécies modelo para fixação biológica de nitrogênio em soja, apresentando alto nível de eficiência simbiótica.

Por fim, a cepa WSM4799 encontra-se agrupada com *B. barranii* CC1502 e *B. centrosematidis* SEMIA 431, com suporte estatístico elevado (bootstrap = 97). Esses agrupamentos evidenciam a diversidade de simbioses associados a leguminosas não tradicionais, conforme descrito por Stepkowski et al. (2007), que discutem a origem e a dispersão de *Bradyrhizobium* em ambientes diversificados.

Árvore Genômica

A análise genômica mostra as relações evolutivas entre as cepas do gênero *Bradyrhizobium* estudadas (Figura 10). É possível observar que as estirpes não formam um único grupo monofilético, o que indica a existência de divergências evolutivas, refletindo adaptações a diferentes condições ambientais ou hospedeiros. Essa distribuição também pode indicar que essas linhagens adquiriram características adaptativas de forma independente, possivelmente por meio de transferência horizontal de genes (THG). Segundo Ochman et al. (2000), a THG entre as espécies pode ser uma força importante para a diversificação e adaptação dos rizóbios.

Os números acima dos ramos correspondem aos valores de suporte estatístico bootstrap GBDP superiores a 60%, obtidos a partir de 100 replicações, com um suporte médio de ramo de 84,8%. A árvore foi enraizada no ponto médio e apresenta clados bem definidos, sustentados por valores de bootstrap elevados, indicando robustez estatística. Segundo Felsenstein (1985), valores elevados de bootstrap indicam que a separação entre linhagens é robusta e pode ser considerada confiável.

A cepa WSM4804 aparece em um clado com *B. yuanmingense* CCBAU 10771, com suporte estatístico máximo, corroborando os resultados observados nas árvores baseadas nos genes 16S rRNA, nodA, nodB, nodC, nodD e concatenação dos genes nodABCD. De forma similar, a cepa BR 3287 apresenta suporte moderado (bootstrap = 87) com *B. centrosematidis* LMG 29515.

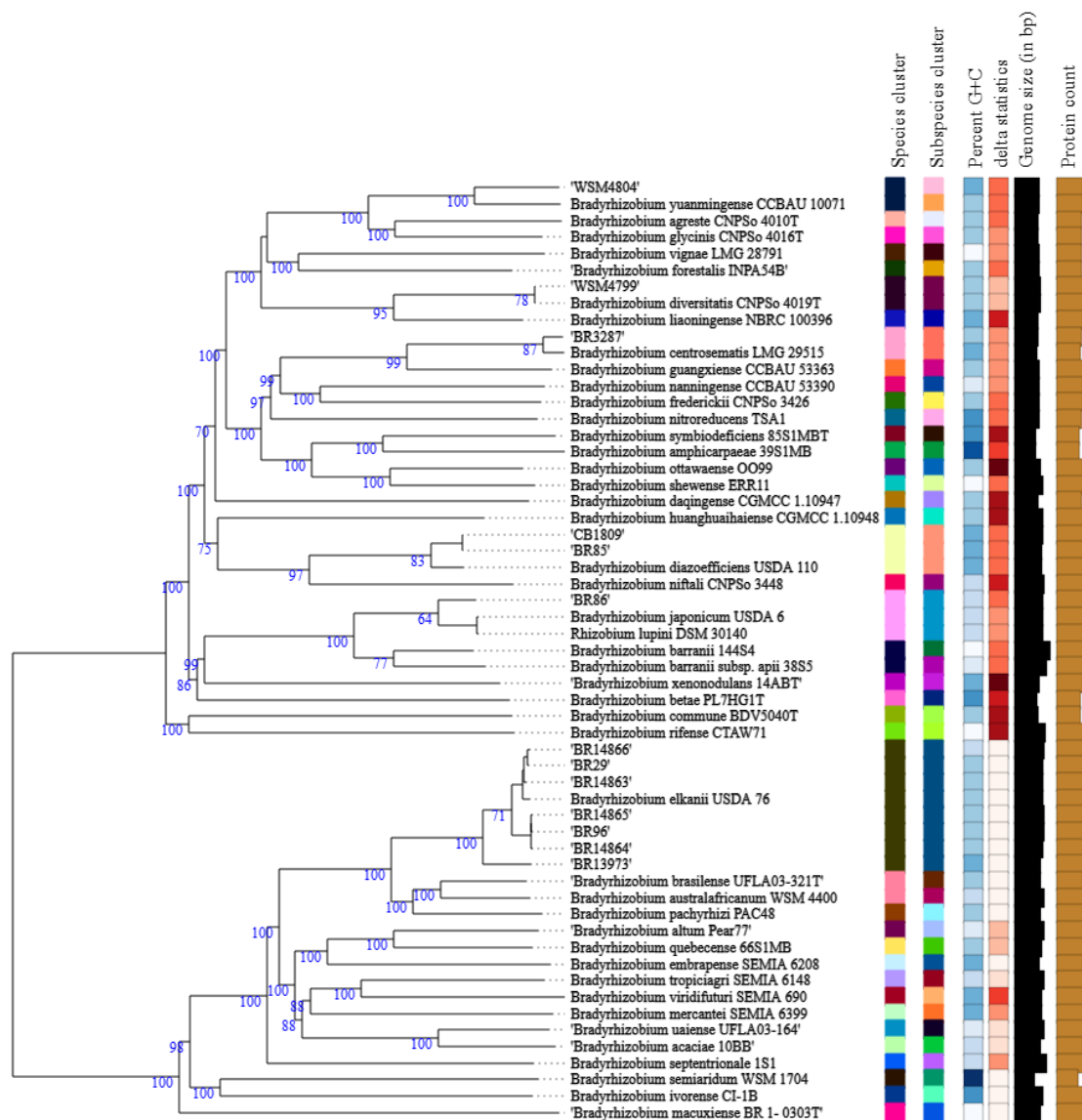


Figura 10: Árvore genômica construída a partir das cepas de *Bradyrhizobium* sp. BR 85, BR 86, BR 3287, BR 14863, BR 14864, BR14865, BR 14866, BR 96, BR 29, BR 13973, CB1809, WSM4799, WSM4804 e espécies-tipo.

Trata-se de uma cepa isolada a partir de nódulos de feijão-caupi em uma área que anteriormente foi cultivada com soja, localizado no bioma Cerrado, no Nordeste brasileiro, mais especificamente no estado do Piauí. Essa cepa apresenta peculiaridades genéticas distintas, provavelmente adquiridas por meio de um evento de THG, o que confirma a relação genética estreita entre essas estirpes.

A árvore foi enraizada no ponto médio e apresenta clados bem definidos, sustentados por valores de bootstrap elevados, indicando robustez estatística. Segundo Felsenstein (1985), valores elevados de bootstrap indicam que a separação entre linhagens é robusta e pode ser considerada confiável.

A cepa WSM4804 aparece em um clado com *B. yuanmingense* CCBAU 10771, com suporte estatístico máximo, corroborando os resultados observados nas árvores baseadas nos genes 16S rRNA, nodA, nodB, nodC, nodD e concatenação dos genes nodABCD. De forma similar, a cepa BR 3287 apresenta suporte moderado (bootstrap = 87) com *B. centrosematis* LMG 29515. Trata-se de uma cepa isolada a partir de nódulos de feijão-caupi em uma área que anteriormente foi cultivada com soja, localizado no bioma Cerrado, no Nordeste brasileiro, mais especificamente no estado do Piauí. Essa cepa apresenta peculiaridades genéticas distintas, provavelmente adquiridas por meio de um evento de THG, o que confirma a relação genética estreita entre essas estirpes.

Em relação à cepa BR 85 (= SEMIA 5080), observa-se que pertence à espécie *B. diazoefficiens*, tendo sido isolada de nódulos de soja cultivados em Brasília, no bioma Cerrado. Essa cepa é recomendada para soja no Brasil desde 1994 e corresponde às linhagens USDA 110 e CB1809, esta última utilizada como inoculante na Austrália desde a década de 1990. A ampla utilização desta cepa em diferentes regiões reflete sua capacidade de adaptação a distintas condições ambientais e a diferentes espécies de leguminosas. A cepa BR 86 apresenta um fundo cromossômico distinto de BR 85, porém compartilha genes de simbiose idênticos, sugerindo que BR 86 pode ter sido receptora de genes simbióticos transferidos de um doador semelhante a BR 85 e CB1809.

Conforme observado no dendrograma, BR 86 (= SEMIA 5079) está relacionada cromossomicamente à estirpe *B. japonicum* USDA 6, uma linhagem antiga recomendada para soja no Brasil desde 1994, isolada de nódulos de soja

cultivados em Brasília, no bioma Cerrado. Essa linhagem exemplifica a continuidade da seleção de cepas adaptadas a solos ácidos e de baixa fertilidade, comuns no Cerrado, região central do Brasil.

As cepas BR 14866 e BR 29 apresentam proximidade genética, sendo *B. elkanii* USDA 76 a espécie mais próxima. As cepas BR 14863 e BR 14866 foram isoladas de nódulos de soja cultivados em solo coletado no bioma Amazônico, especificamente em áreas de cerrado com histórico prévio de cultivo de soja. É plausível que essas cepas também tenham passado por eventos de THG e derivem da BR 29 (= 29W = SEMIA 5019), uma linhagem antiga recomendada para soja no Brasil desde 1979.

A formação de nódulos em condições de cerrado indica uma adaptação à acidez do solo e à disponibilidade de nutrientes típicos dessa região. Esse processo de adaptação local é fundamental para a diversificação das linhagens, especialmente em regiões tropicais, onde as condições do solo e a diversidade de leguminosas são altamente variáveis. Como discutido por Hillis e Bull (1993), a adaptação das cepas de rizóbios pode ocorrer como resposta direta a essas variações ambientais, levando à formação de linhagens mais especializadas.

De forma semelhante, as cepas BR 14865, BR 96 e BR 14864 formam um clado, indicando a existência de uma possível relação genética entre elas. A proximidade filogenética observada sugere que essas cepas compartilham características genéticas e funcionais adaptadas a condições ambientais ou hospedeiros similares. Observa-se que a espécie-tipo mais próxima dessas cepas também é *B. elkanii* USDA 76. Segundo Andrews et al. (2018), esse tipo de agrupamento pode ser explicado pela persistência de características genéticas ancestrais ou pela seleção imposta por pressões ambientais semelhantes. Essa relação coesa entre essas cepas são indicativos de uma adaptação a solos ou cultivos específicos, como a soja, cultivada no Brasil e em outras regiões tropicais.

Acredita-se que as estirpes BR 14864 e BR 14865, originadas de nódulos de soja cultivada em solo florestal coletado na Amazônia, em Roraima, possam representar reisolados da BR 96, que é uma linhagem antiga (= SEMIA 587), recomendada para soja no Brasil desde 1979, isolada a partir de nódulos de soja cultivados no Rio Grande do Sul em bioma de Mata Atlântica. A formação de

nódulos nessas condições é incomum, não sendo possível descartar a hipótese de contaminação das sementes utilizadas. Estudos como os de Döbereiner (1997), Nakei et al. (2022) e Zhang et al. (2024) destacam que práticas agrícolas, incluindo o uso de sementes contaminadas ou a introdução inadvertida de linhagens, podem influenciar a dinâmica das populações de rizóbios

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* tendem a evoluir em resposta a condições abióticas, como acidez do solo e disponibilidade de nutrientes. A interação simbiótica com diferentes espécies de leguminosas resulta na capacidade de formar nódulos e melhorar a FBN (Döbereiner, 1997; Hungria, 2022; Favero et al. 2021). Essa seleção, aliada à adaptação a diferentes biomas, explicaria a variabilidade observada nas linhagens analisadas. Além do mais, a pressão de seleção nas leguminosas favorece a aquisição de novos genes, como discutido por Liu et al. (2023), que destacam a importância da transferência de genes na evolução das linhagens de rizóbios.

A cepa BR 13973 aparece logo abaixo da BR 14864, tendo sido isolada de um campo experimental no bioma Mata Atlântica, no estado do Rio de Janeiro, em uma área sem registro recente de cultivo de soja. Contudo, por se tratar de uma área experimental, não se pode descartar a ocorrência de cultivos anteriores. Essa cepa agrupou-se em um ramo filogenético distinto, com maior distância em relação às demais, sugerindo tratar-se de uma variação genética mais acentuada, possivelmente correspondente a uma simbiovar. Apesar de sua posição isolada, permanece próxima ao clado sustentado por *B. elkanii* USDA 76, com suporte bootstrap moderado (66), indicando a existência de divergência genética parcial.

Essa posição filogenética isolada pode ser indicativa de eventos de THG, hipótese sustentada pelo menor valor de bootstrap e maior distância filogenética em relação às cepas mais coesas. A diversidade filogenética observada entre as linhagens de *Bradyrhizobium* resulta de uma combinação de fatores, incluindo adaptação ao solo, coevolução com leguminosas e aquisição de genes via THG, conforme demonstrado por Barcellos et al. (2006), Man et al. (2008), Dlodlu et al. (2018) e Cao et al. (2021).

De acordo com Ochman et al. (2000), linhagens de *Bradyrhizobium* podem adquirir genes relacionados ou à FBN ou adaptação ao solo de outros

microrganismos no ambiente, contribuindo para a variabilidade genética dessas linhagens. Além disso, Andrews et al. (2018), enfatizam que a THG de genes relacionados à simbiose é um fenômeno amplamente documentado entre linhagens rizobianas. Esse processo ocorre em diferentes regiões geográficas, não se limita a gêneros específicos de rizóbios e pode acontecer tanto dentro de um mesmo gênero quanto entre gêneros distintos. A transferência desses genes para bactérias previamente adaptadas às condições locais do solo pode capacitar essas linhagens a estabelecerem relações simbióticas com leguminosas anteriormente incompatíveis, promovendo a nodulação e a fixação biológica.

Identificação taxonômica das linhagens

Os resultados da análise gerada no *Genome Server* (TYGS) identificaram as espécies e os tipos das cepas de rizóbios estudadas (Tabela 3).

Tabela 3- Identificação e classificação de espécies-tipo de rizóbios realizada com base nos resultados do *Genome Server* (TYGS).

Cepas	Espécie-Tipo
BR85	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>
BR86	<i>Rhizobium lupini</i>
BR3287	<i>Bradyrhizobium centrosematis</i>
BR14863	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
BR14864	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
BR14865	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
BR14866	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
BR96	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
BR29	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
BR13973	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
CB1809	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
WSM4799	<i>Bradyrhizobium diversatis</i>
WSM4804	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>

Foi observado que os isolados se distribuem entre os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, com destaque para a espécie *B. elkanii*. Isso está alinhado com pesquisas anteriores que mostram que *Bradyrhizobium* é o gênero

predominante nas interações simbióticas com leguminosas no Brasil (Döbereiner, 1997; Zilli et al., 2013; Delamuta et al., 2017). A alta taxa de identificação das cepas de *B. elkanii* (sete das 13 analisadas) reflete sua ampla utilização como inoculante comercial para soja, o que se traduz em sua ótima adaptação aos solos e às condições agrícolas brasileiras.

Não é surpresa que *B. elkanii* seja predominante entre as cepas analisadas, já que essa linhagem tem um histórico de uso no Brasil como uma das mais eficazes na fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esse fato reforça a importância da espécie, principalmente em um país onde a soja tem um papel econômico tão relevante. No entanto, a diversidade observada, com a presença de outras espécies como *B. diazoefficiens* e *Rhizobium lupini*, sugere que, além das espécies dominantes, outras linhagens também podem estar desempenhando funções ecológicas essenciais. Por exemplo, *B. diazoefficiens* é reconhecida pela sua capacidade de fixar nitrogênio em diversos tipos de solo, enquanto *Rhizobium lupini* é frequentemente associada a leguminosas menos comuns, o que indica que essas cepas podem ter um papel funcional mais abrangente.

A identificação de espécies como *B. ottawaense*, *B. diversatis* e *B. yuanmingense* é uma adição interessante ao estudo, pois sugere que há uma maior diversidade de rizóbios nos solos tropicais. Esses resultados também ampliam o entendimento sobre a distribuição das espécies dentro do gênero *Bradyrhizobium*. Embora *B. elkanii* seja a mais comum, essas outras linhagens podem estar interagindo com diferentes tipos de leguminosas ou ambientes, desempenhando funções ecológicas complementares. Vale ressaltar que o isolamento dessas novas cepas pode estar relacionado a adaptações locais, como respostas a pressões ambientais específicas, tais como o pH do solo ou a disponibilidade de nutrientes, que afetam diretamente a simbiose.

Outro ponto relevante é a cepa BR 13973, que, apesar de estar classificada como *Bradyrhizobium elkani*, apresenta grande potencial para ser uma simbiovar. Entretanto, outras análises seriam necessárias para afirmar tal hipótese. Estudar aspectos voltados à filogenia e à taxonomia é fundamental para compreender melhor a diversidade genética e funcional desse gênero, uma vez que novas linhagens podem apresentar características únicas, como a

capacidade de nodular leguminosas específicas ou até mesmo resistir a estresses ambientais.

A diversidade observada nas cepas de rizóbios isoladas neste estudo confirma que as populações de *Bradyrhizobium*, em especial, são muito mais complexas do que uma simples predominância de espécies amplamente utilizadas como inoculantes.

4. CONCLUSÕES

A partir da análise genômica, conclui-se que as cepas BR 14864 e BR 14865 são reisolados da BR 96. As cepas BR 14863 e BR 14866 são possíveis reisolados de BR 29 (= 29W = SEMIA 5019), uma linhagem antiga recomendada para soja no Brasil desde 1979.

A cepa BR 86 tem um fundo cromossômico diferente de BR 85, mas possui genes de simbiose idênticos, o que sugere que BR 86 pode ter sido receptora da transferência de genes de simbiose de um doador semelhante a BR 85 e CB1809. Além disso, a cepa BR 13973 apresenta potencial para ser classificada como uma simbiovar.

As diferentes árvores construídas com base em genes genômicos e simbióticos, como 16S rRNA, nodA, nodB, nodC e nodD, revelaram tanto conformidades quanto discrepâncias, refletindo a influência de eventos de recombinação e de pressões seletivas locais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 705.
- Andrews, M., De Meyer, S., James, E. K., Stępkowski, T., Hodge, S., Simon, M. F., & Young, J. P. W. (2018). Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance. *Genes*, 9(7), 321.
- Barcellos, F., Menna, P., Batista, J. D. S., & Hungria, M. (2006) Transferência horizontal de genes simbióticos de estirpes inoculantes de *B. japonicum* para estirpes de rizóbios nativas dos solos dos Cerrados. In Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Jornada acadêmica da Embrapa Soja. Londrina. Embrapa Soja (Vol. 2).
- Bullard, G. K., Roughley, R. J., & Pulsford, D. J. (2005) The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia: 1953–2003. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(3), 127-140.
- Cao, Y., Tie, D., Le Zhao, J., Wang, XB, Yi, JJ, Chai, YF, ... & Yue, M. (2021). Diversity and distribution of *Sophora davidii* rhizobia in habitats with different irradiances and soil characteristics in the Loess Plateau area of China. *Microbiologia Sistemática e Aplicada*, 44 (4), 126224.
- Cummings, S. P., Gyaneshwar, P., Vinuesa, P., Farruggia, F. T., Andrews, M., Humphry, D., ... & James, E. K. (2009) Nodulation of *Sesbania* species by *Rhizobium* (Agrobacterium) strain IRBG74 and other rhizobia. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2510-2525.
- de Souza Moreira, F. M., Da Silva, K., Nóbrega, R. S. A., & De Carvalho, F. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1(2), 74-74.
- Delamuta, J. R. M., Menna, P., & Hungria, M. (2014). Análise filogenética do gene nodY/K revela coevolução e transferência horizontal entre *Bradyrhizobium* e leguminosas. In *Anais do 14º Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental*, João Pessoa (Resumo 74-1).
- Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_9), 3342-3351.
- Delamuta, J. R. M., Menna, P., Ribeiro, R. A., & Hungria, M. (2017). Filogenias de genes simbióticos de simbiontes de *Bradyrhizobium* de leguminosas de importância econômica e ambiental no Brasil dão suporte à definição

- dos novos simbiovares pachyrhizi e sojae. *Systematic and Applied Microbiology*, 40 (5), 254-265.
- Dludlu, M. N., Chimphango, S. B. M., Walker, G., Stirton, C. H., & Muasya, A. M. (2018) Horizontal gene transfer among rhizobia of the Core Cape Subregion of southern Africa. *South African Journal of Botany*, 118, 342-352.
- Döbereiner, J. (1997) Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 771-774.
- Farris, J. S. (1972). Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *The American Naturalist*, 106(951), 645-668.
- Favero, V. O., Carvalho, R. H., Motta, V. M., Leite, A. B. C., Coelho, M. R. R., Xavier, G. R., ... & Urquiaga, S. (2021) *Bradyrhizobium* as the only rhizobial inhabitant of mung bean (*Vigna radiata*) nodules in tropical soils: A strategy based on microbiome for improving biological nitrogen fixation using bio-products. *Frontiers in Plant Science*, 11, 602645.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Fred, E. B., & Waksman, S. A. (1928) *Laboratory manual of general microbiology: with special reference to the microorganisms of the soil*. McGraw-Hill Book Company, Inc. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6957>, 145p.
- Hassen, A. I., Bopape, F. L., van Vuuren, A., Gerrano, A. S., & Morey, L. (2023) Symbiotic interaction of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) landraces with *Rhizobia* spp. from other legume hosts reveals promiscuous nodulation. *South African Journal of Botany*, 160, 493-503.
- Hesterberg, T. (2011) Bootstrap. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(6), 497-526.
- Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, 42(2), 182-192.
- Hungria, M. (2023) Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.
- Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2022). Fixação biológica do nitrogênio. In M. C. Meyer, A. de F. Bueno, S. M. Mazaro, & J. C. da Silva (Eds.), *Bioinsumos na cultura da soja* (pp. 141-162). Embrapa.
- Hungria, M., de S Andrade, D., de O Chueire, L. M., Probanza, A., Gutierrez-Mañero, F. J., & Megías, M. (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11-12), 1515-1528.

- Hungria, M., Franchini, J. C., Campo, R. J., Crispino, C. C., Moraes, J. Z., Sibaldelli, R. N., ... & Arihara, J. (2006). Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(4), 927-939.
- Hungria, M., & Mendes, I. C. (2015). Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis?. *Biological nitrogen fixation*, 1009-1024.
- Hungria, M., Menna, P., & Delamuta, JRM (2015) *Bradyrhizobium*, o ancestral de todos os rizóbios: Filogenia de genes de manutenção e fixação de nitrogênio. *Fixação biológica de nitrogênio*, 191-202.
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016) The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome biology*, 17, 1-11.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., ... & Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA research*, 9(6), 189-197.
- Lemaire, B., Dlodlo, O., Chimphango, S., Stirton, C., Schrire, B., Boatwright, J. S., ... & Muasya, A. M. (2015) Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). *FEMS microbiology ecology*, 91(2), 1-17.
- Liu, S., Jiao, J., & Tian, CF (2023). Adaptive evolution of rhizobial symbiosis beyond horizontal gene transfer: From genome innovation to regulation reconstruction. *Genes*, 14 (2), 274.
- Man, C. X., Wang, H., Chen, W. F., Sui, X. H., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2008). Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China. *Plant and soil*, 310(1), 77-87.
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2022) TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic acids research*, 50(D1), D801-D807.
- Menna, P., & Hungria, M. (2011) Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 3052-3067.
- Menna, P., Barcellos, F. G., & Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 2934-2950.

- Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., & Stępkowski, T. (2004) Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support both vertical and lateral co-transfer of genes within the genus *Bradyrhizobium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30 (3), 720-732.
- Muro, M. A.; Luchi, M. R. (1989) Preservação de Microrganismos. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 65 p.
- Mwenda, G. M., O’Hara, G. W., De Meyer, S. E., Howieson, J. G., & Terpolilli, J. J. (2018) Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 291-299.
- Nakei, MD, Venkataramana, PB, & Ndakidemi, PA (2022) Rizóbios noduladores de soja: ecologia, caracterização, diversidade e funções de promoção do crescimento. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 824444.
- Nei, M. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics* (Vol. 333). Oxford University Press
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304.
- Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 519-546.
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(11), 5607-5612.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J. P. W., & Masson-Boivin, C. (2016) Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends in microbiology*, 24(1), 63-75.
- Rogel, M. A., Ormeno-Orrillo, E., & Romero, E. M. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96-104.
- Saitou N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Shiro, S., Matsuura, S., Saiki, R., Sigua, G. C., Yamamoto, A., Umehara, Y., ... & Saeki, Y. (2013) Genetic diversity and geographical distribution of indigenous soybean-nodulating *Bradyrhizobia* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3610-3618.
- Sprent, J. I., & Platzmann, J. (2001) *Nodulation in legumes* (p. 146p). Kew: Royal Botanic Gardens.

- Stepkowski, T., Hughes, C. E., Law, I. J., Markiewicz, Ł., Gurda, D., Chlebicka, A., & Moulin, L. (2007) Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3254-3264.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B., & Ronson, C. W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8985-8989.
- Swofford, D. L. (1991) PAUP, phylogenetic analysis using parsimony. version 3.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois, 302p.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021) MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tamura, K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol Biol Evol*, 9(4), 678-687.
- Vincent, J. M. (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific, 164 p.
- Wattam, A. R., Davis, J. J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., ... & Stevens, R. L. (2017) Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic acids research*, 45(D1), D535-D542.
- Whitman, W. B. (2015) Genome sequences as the type material for taxonomic descriptions of prokaryotes. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 217-222.
- Young, J. P. W., Crossman, L. C., Johnston, A. W., Thomson, N. R., Ghazoui, Z. F., Hull, K. H., ... & Parkhill, J. (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome biology*, 7, 1-20.
- Zhang, Y., Ku, YS, Cheung, TY, Cheng, SS, Xin, D., Gombeau, K., ... & Chan, TF (2024) Challenges to rhizobial adaptability in a changing climate: Genetic engineering solutions for stress tolerance. *Microbiological Research*, 127886.
- Zilli, J. É., Pereira, G. M. D., França Júnior, I., Silva, K. D., Hungria, M., & Rouws, J. R. C. (2013) Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. *Acta Amazonica*, 43, 153-160.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E PARÂMETROS GENÉTICOS EM CEPAS DE RIZÓBIOS NODULADORES DE SOJA

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) desempenha um papel essencial na produtividade da soja (*Glycine max.*), sendo mediada por estirpes de *Bradyrhizobium* altamente eficientes. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica e os parâmetros genéticos de diferentes estirpes de rizóbios noduladores da soja, oriundas do Brasil e da Austrália. Experimentos conduzidos em casa de vegetação analisaram o número de nódulos, altura das plantas e massa seca da parte aérea, utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (Scott-Knott). Os parâmetros genéticos, como herdabilidade e coeficientes de variação, foram estimados para caracterizar a influência genética e ambiental na nodulação. Os resultados indicaram variações significativas na eficiência simbiótica entre as estirpes testadas, destacando a importância da seleção de linhagens adaptadas para maximizar a FBN. Essas informações contribuem para estratégias de melhoramento biotecnológico e manejo sustentável da cultura da soja.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*, fixação biológica de nitrogênio, nodulação, variabilidade genética.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) plays a crucial role in soybean (*Glycine max.*) productivity, being mediated by highly efficient *Bradyrhizobium* strains. This study aimed to evaluate the symbiotic efficiency and genetic parameters of different soybean-nodulating rhizobial strains originating from Brazil and Australia. Greenhouse experiments analyzed the number of nodules, plant height, and shoot dry mass using analysis of variance (ANOVA) and mean comparison tests (Scott-Knott). Genetic parameters, such as heritability and coefficients of variation, were estimated to characterize the genetic and environmental influence on nodulation. The results showed significant variations in symbiotic efficiency among the tested strains, highlighting the importance of selecting adapted strains to maximize BNF. These findings contribute to biotechnological improvement strategies and sustainable soybean crop management.

Keywords: *Bradyrhizobium*, biological nitrogen fixation, nodulation, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max.*) é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, sendo amplamente cultivada devido ao seu alto valor econômico e nutricional (Hungria, 2001). Um dos principais fatores que contribuem para a sua produtividade é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que estabelecem simbiose com as raízes da planta, formando nódulos e fornecendo nitrogênio de maneira sustentável (Zilli et al., 2013). Essa interação reduz a necessidade de fertilizantes nitrogenados, promovendo benefícios agrônômicos e ambientais (Vilas Boas e Moreira, 2012).

A eficiência simbiótica das estirpes de *Bradyrhizobium* pode variar significativamente dependendo da linhagem bacteriana, do ambiente e das condições edafoclimáticas (Delamuta et al., 2017). Estudos têm demonstrado que a escolha de estirpes eficientes é fundamental para otimizar a FBN e garantir maior a produtividade da soja (Hungria et al., 2022). Nesse contexto, a avaliação da eficiência simbiótica e dos parâmetros genéticos das estirpes noduladoras é essencial para a seleção de linhagens mais adaptadas e competitivas (Barcellos et al., 2006).

A avaliação da eficiência simbiótica das cepas de rizóbios noduladores de soja envolve a análise da capacidade de nodulação, do crescimento vegetal e da fixação de nitrogênio em diferentes condições ambientais. Parâmetros genéticos, como a presença e a expressão de genes envolvidos na simbiose, também são fatores determinantes na adaptação e eficiência dessas bactérias (Kaneko et al., 2002). De acordo com Dill (2022), estudos demonstram que a variabilidade genética entre cepas pode influenciar diretamente a compatibilidade com cultivares de soja, impactando na produtividade. Portanto, a identificação e seleção de estirpes eficientes são estratégias fundamentais para melhorar a fixação biológica de nitrogênio e promover sistemas agrícolas mais sustentáveis.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas no Brasil e na Austrália, analisando o número de nódulos, altura das plantas e massa seca da parte

aérea. Além disso, parâmetros genéticos, como herdabilidade e coeficientes de variação, foram estimados para compreender a influência dos fatores genéticos e ambientais na nodulação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O presente estudo foi desenvolvido no *Centre for Rhizobium Studies* localizado na *Murdoch University*, situado no município de Perth/WA (Austrália Ocidental; Latitude: -32° 03' 59.47" S e Longitude: 115° 50' 6.29" E), em parceria com a Embrapa Agrobiologia e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. As estirpes brasileiras utilizadas neste trabalho foram SEMIA 5080 (BR85), SEMIA 5079 (BR86), SEMIA 5019 (BR 29), BR 3287, EER09 (BR 14864), ERR06 (BR 14865), ERR148 (BR 14863), ERR94 (BR 14866), SEMIA587 (BR 96) e BR 13973, obtidas da coleção de culturas do CRB-JD. As estirpes australianas utilizadas foram CC789, CB1809, WSM4804 e WSM4799, obtidas do *Centre for Rhizobium Studies*. As bactérias foram isoladas a partir de nódulos coletados diretamente de plantas de soja cultivadas nos campos experimentais de ambos os países (Tabela 4).

Tabela 4 – Estirpes isoladas dos campos experimentais da Embrapa Agrobiologia e da *Murdoch University* utilizadas no estudo.

Código	Espécie	País	Origem	Hospedeiro de origem
BR85 (SEMIA5080)	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	Brasil	Planaltina/ DF	<i>Glycine max</i>
BR86 (SEMIA 5079)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Brasil	Planaltina/DF	<i>Glycine max</i>
BR3287	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Bom Jesus/PI	<i>Vigna unguiculata</i>
BR14864	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Boa Vista/RR	<i>Glycine max</i>
BR 14865 (ERR06)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Boa Vista/RR	<i>Glycine max</i>
BR14863 (ERR148)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Alto Alegre/RO	<i>Glycine max</i>
BR96 (SEMIA587)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Santa Rosa/RS	<i>Glycine max</i>
BR29 (SEMIA5019)	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> .	Brasil	Piraí/RJ	<i>Glycine max</i>
BR13973	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Seropédica/RJ	<i>Glycine max</i>
BR14866	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Brasil	Boa Vista/RR	<i>Glycine max</i>
CB1809	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	África	South Africa	<i>Glycine max</i>
WSM4804	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Austrália	Kununurra/WA	<i>Glycine max</i>
WSM4799	<i>Bradyrhizobium diversitatis</i>	Austrália	Nambung/wa	<i>Glycine max</i>

Fonte: Autora (2024).

No período de novembro/dezembro de 2022 e maio/junho de 2023 foram

realizados dois experimentos com o objetivo de autenticar os rizóbios e avaliar a simbiose das cepas Australianas e brasileiras, respectivamente, em plantas de soja. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento em blocos ao acaso (DBC), com três repetições, nas quais os tratamentos utilizados com as cepas Australianas foram CB1809, WSM4804 e WSM4799. E os tratamentos utilizados com as cepas brasileiras foram BR 85, BR 86, BR 29, BR 3287, BR 14864, BR 14865, BR 14863, BR 14866, BR 96 e BR 13973, todas recomendadas para a cultura da soja, além de um controle absoluto (isento de inoculante e de N).

O experimento foi conduzido em vasos plásticos esterilizados de 800 ml; cada vaso representou uma unidade experimental. Como substrato, foi utilizada a vermiculita, que inicialmente foi lavada e, em seguida, deixada de molho em água por cerca de oito horas. Após esse processo, foi seca em estufa a 100°C por 24 horas. A vermiculita foi peneirada com malha de 3,0 mm, e o pH foi verificado e corrigido para aproximadamente 6,5.

Para a preparação dos vasos, utilizou-se toalhas de papel esterilizadas para cobrir completamente os orifícios de drenagem. A vermiculita foi colocada nos vasos até a borda, os quais foram cobertos com papel-alumínio e autoclavados em seguida. Após o processo de autoclavagem, os vasos foram transferidos para uma estufa limpa. Os vasos foram lavados duas vezes com água fervida para lixiviação do nitrogênio (N) e, em seguida, deixados para drenar e esfriar. Posteriormente, foram cobertos com uma folha de plástico para evitar aerossóis na superfície do substrato. Imediatamente antes do plantio, o substrato foi umedecido com uma aplicação generosa de água estéril.

As sementes foram esterilizadas por meio das seguintes etapas: lavagem com etanol a 70% por 1 minuto; em seguida, foram lavadas duas vezes em água estéril; desinfestação com hipoclorito de sódio a 4%, por 1 minuto; e lavagem com água esterilizada por seis vezes consecutivas. Após a desinfestação, as sementes foram dispostas em placas de Petri esterilizadas contendo ágar-água, as quais foram embrulhadas em papel-alumínio para exclusão da luz. Após a embebição durante a noite, a placa foi invertida para permitir o desenvolvimento descendente das radículas.

As sementes pré-germinadas foram depositadas nos vasos com o auxílio

de pinças estéreis e manuseadas cuidadosamente, evitando-se o contato com a radícula. As sementes foram inseridas nos orifícios previamente preparados no substrato, posicionando-se a radícula orientada para baixo, de forma que cada vaso recebeu três sementes. As sementes foram inoculadas com 0,5 ml de suspensão de rizóbios, e a superfície dos vasos foi coberta por uma camada de esferas de alcateno estéreis. A irrigação e a solução nutritiva, também estéreis, foram adicionadas por meio de um tubo de irrigação vedado.

As plantas foram coletadas 30 dias após a inoculação para avaliação dos caracteres. A parte aérea, as raízes e os nódulos foram secos em estufa a 65°C, por sete dias. A análise de variância e o teste de comparação de médias de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para as variáveis: número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA), foram executados no software R, utilizando o pacote ExpDes.pt.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de variância

No experimento de eficiência simbiótica com estirpes de *Bradyrhizobium* conduzido em casa de vegetação, o tratamento que não recebeu inoculação não apresentou formação de nódulos, indicando a ausência de contaminação do experimento. Os resultados apresentados na Tabela 5 evidenciam os quadrados médios para as variáveis número de nódulos (NN), altura de plantas (ALTP) e massa seca da parte aérea (MSPA).

Tabela 5 – Quadrados médios obtidos no teste nodulação e matéria seca de plantas de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium*, referentes às variáveis número de nódulos (NN), altura de plantas (ALTP) e massa seca da parte aérea (MSPA).

FV	GL	QM		
		NN	ALTP	MSPA
Blocos	2	393.4	9.206	0.00098
Tratamentos	14	6972.7**	63.543**	0.1712**
Resíduos	28	1115.8	7.198	0.00278
Total	44			
Mínimo		110.0	20.58	1.2
Máximo		192.00	35.80	45.3
CV (%)		30.20%	9.07%	6.95%

* e **significativo a 5% e a 1% pelo teste F.

Os tratamentos mostraram efeito altamente significativo ($p < 0.01$) para todas as variáveis, demonstrando que as diferentes estirpes influenciaram significativamente o desempenho das plantas. O QM de 6972.7 para NN indica diferenças marcantes no número de nódulos entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Campo et al. (2009), que, em um estudo sobre fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja, observaram grande variação na nodulação em função das estirpes e das condições ambientais.

Para a variável ALTP, o QM de 63.543 aponta uma influência relevante na altura das plantas, ainda que com menor magnitude em relação à nodulação. De acordo com Hungria et al. (2015), o crescimento das plantas está diretamente relacionado à eficiência simbiótica das estirpes utilizadas. Para MSPA, o QM de 0.1712 destaca diferenças significativas na produção de matéria seca da parte aérea, um reflexo direto da capacidade das estirpes de fornecer nitrogênio suficiente para a planta, conforme relatado por Carvalho et al. (2014).

Os resíduos, que representam a variação experimental não explicada pelos blocos ou tratamentos, apresentaram valores baixos para duas das três variáveis: 0.00278 para MSPA e 7.198 para ALTP, exceto 1115.8 para NN. Esses valores indicam boa precisão experimental e reforçam a confiabilidade dos dados analisados, de forma semelhante ao observado por Xavier et al. (2007), que destacam a importância de baixos resíduos para interpretações robustas em experimentos com rizóbios.

Além disso, os coeficientes de variação (CV%) foram de 30.20% para NN, 9.07% para ALTP e 6.95% para MSPA. O maior CV para NN sugere maior heterogeneidade na resposta simbiótica, como relatado por Batista et al. (2017), enquanto os menores CVs para ALTP e MSPA indicam alta precisão experimental, reforçando a qualidade dos resultados obtidos. Outro aspecto a ser considerado é que a diversidade genética das estirpes de *Bradyrhizobium*, contribui significativamente para a magnitude da variação observada nos experimentos. Esse fenômeno é bem ilustrado em estudos de produtividade agrícola, nos quais características como a eficiência na fixação biológica de nitrogênio são influenciadas por fatores genéticos da planta e do microrganismo, além do ambiente em que o experimento é conduzido. Esse conjunto de fatores justifica os coeficientes de variação encontrados, como discutido por Ramalho (2005) e Pimentel-Gomes (2023).

O intervalo de resposta observado também destaca a amplitude das diferenças entre os tratamentos. Para NN, o mínimo de 1.2 e o máximo de 45.3 refletem grande variação na capacidade nodulante das estirpes, corroborando os resultados encontrados por Soares et al. (2006) sobre a variabilidade genética e fenotípica de *Bradyrhizobium*. Para ALTP, o intervalo de 110.0 cm a 192.0 cm evidencia que algumas estirpes foram capazes de promover plantas mais

vigorosas, enquanto para MSPA, o intervalo de 20.58 g a 35.80 g reflete diferenças importantes na produção de biomassa aérea, um indicador crucial de eficiência simbiótica (Hungria e Mendes, 2015)

Teste de comparação de médias

Os resultados do teste de comparação de médias de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para as variáveis: número de nódulos por planta (NN), altura de plantas (ALTP) e massa seca de plantas (MSP) de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* em experimento de eficiência simbiótica são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Teste de comparação de médias de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para as variáveis: número de nódulos por planta (NN), altura de plantas (ALTP) e massa seca de plantas (MSP) de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* em experimento de eficiência simbiótica.

Tratamentos	NN* (por planta)	ALTP* (cm)	MSP* (g planta⁻¹)
BR 85	192,0 a	35.80 a	1.00 a
BR 86	137,67 a	32.10 a	1.00 a
BR 3287	75,67 c	25.93 b	1.00 a
BR 14863	99,00 b	31.73 a	0.56 b
BR 14864	96,33 b	30.73 a	0.49 c
BR 14865	100,67 b	31.47 a	0.62 b
BR 14866	100,33 b	30.73 a	0.54 b
BR 96	102,00 b	34.10 a	1.00 a
BR 29	114,00 b	29.27 a	1.00 a
BR 13973	122,67 a	34,23 a	0.65 b
CB1809	144,67 a	32.00 a	1.00 a
WSM4799	95,67 b	25.08 b	0.62 b
WSM4804	129,67 a	29.17 a	0.48 c
UNINOCULATE	-	20.75 c	0.44 c
D			
CV%	30.20%	5.76%	7.49%

Embora todas as estirpes estudadas tenham apresentado eficiência na nodulação, as estirpes que se destacaram das demais foram BR 85, BR 86, BR 13973, CB1809 e WSM4804, que apresentaram as maiores médias de número de nódulos, algumas dessas cepas são recomendadas para a fabricação de

inoculantes no Brasil e na Austrália, razão pela qual já se esperava essa alta eficiência na formação de nódulos. De acordo com Cardoso et al. (2009) e Fonseca et al. (2013), a quantidade de nódulos é um bom indicativo da eficiência simbiótica, porém essa variável não pode ser analisada de forma isolada, visto que podem ocorrer a formação de muitos nódulos reduzidos e/ou ineficazes, resultando em menor eficiência na FBN. Além disso, já foi demonstrado que, na cultura da soja, sabe-se que de 15 a 20 nódulos na coroa da raiz principal são considerados suficientes (Cardoso et al., 2009).

O desempenho superior dessas estirpes é consistente com os achados de Xavier et al. (2007) e Campo et al. (2009), que observaram que linhagens geneticamente adaptadas a condições específicas tendem a apresentar maior capacidade nodulante. Em contraste, a ausência de nodulação em plantas não inoculadas confirma a dependência da soja pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), como também relatado por Hungria et al. (2015).

Em relação à altura de plantas (ALTP), BR 3287 e WSM4799 apresentaram menor desempenho, possivelmente devido a limitações genéticas ou à falta de adaptação ao ambiente experimental, como sugerido por Carvalho et al. (2014). As demais cepas apresentaram maiores crescimentos, indicando que essas estirpes, além de eficientes na nodulação, contribuem para o vigor das plantas. Esses resultados corroboram os de Albareda et al. (2009), que destacaram a relação positiva entre a nodulação eficiente e o desenvolvimento vegetativo.

Em relação à variável massa seca da parte aérea, as estirpes BR 85, BR 86, BR 3287, BR 96, BR 29 e CB1809 foram superiores às outras estirpes, com valores significativamente mais altos quando comparados à estirpe WSM4804 e ao tratamento não inoculado. A baixa produção de biomassa em plantas não inoculadas evidencia a importância da inoculação com estirpes eficazes para maximizar a produtividade, especialmente em solos tropicais, como descrito por Soares et al. (2006).

Parâmetros Genéticos

A análise dos parâmetros genéticos (Tabela 7) revelou diferenças importantes entre os caracteres avaliados para número de nódulos (NN), altura

de plantas (ALTP) e massa seca da parte aérea (MSPA). A variância ambiental (σ_e^2) foi menor em MSPA (0,0084) e maior em NN (1115,76), indicando que fatores ambientais têm impacto significativo sobre o NN. Essa sensibilidade às condições ambientais já foi destacada por Freitas et al. (2019), que relataram altos valores de σ_e^2 para o número de nódulos em soja, evidenciando forte interação com o ambiente.

Tabela 7 – Parâmetros genéticos do genótipo de soja para as variáveis: massa seca da parte aérea (MSPA), altura de planta (ALTP) e número de nódulos por planta (NN) de experimento conduzido sob condições controladas na Universidade de Murdoch, Perth/WA- Austrália no ano de 2023.

Caracteres	Parâmetros							
	σ_e^2	σ_g^2	σ_f^2	CV_e	CV_g	h^2	CV_g/CV_e	ΔG
NN	1115.7603	1952.3127	3068.0730	33.00	43.65	0.6363	1.32	72.6079
ALTP	7.1978	18.7816	25.9794	9.07	14.5	0.7229	1.6	7.5908
MSP A	0.0084	0.0069	0.0153	16.35	14.83	0.4510	0.91	0.1149

Variância ambiental (σ_e^2), variância genotípica (σ_g^2), variância fenotípica (σ_f^2), coeficiente de variação ambiental (CV_e), coeficiente de variação genotípico (CV_g), herdabilidade (h^2), razão (CV_g/CV_e) e ganho genético (ΔG).

A variância genotípica (σ_g^2) foi maior em ALTP (18,7816), refletindo que diferenças genéticas entre os genótipos contribuem substancialmente para a variabilidade total. Por outro lado, MSPA apresentou σ_g^2 mais baixa (0,0069), sugerindo menor influência genética. Essa diferença entre características quantitativas também foi observada por Silva et al. (2020), que relataram maior σ_g^2 em características morfológicas de soja, como altura de plantas, em comparação às características relacionadas à fixação biológica de nitrogênio.

Os coeficientes de variação genotípico (CV_g) e ambiental (CV_e) reforçam essas observações. A ALTP apresentou o menor CV_e (9,07%), sugerindo maior estabilidade ambiental, enquanto NN teve o maior CV_e (33%), indicando maior influência do ambiente. Já o CV_g foi mais alto para NN (43,65%), demonstrando que há grande variabilidade genética disponível para essa característica. Esse

achado é consistente com Carvalho et al. (2018), que destacaram o CV_g elevado como um indicativo de bom potencial para o melhoramento genético.

Em relação à herdabilidade (h^2), esta foi maior para ALTP (0,7229), indicando que a maior parte da variação observada é devida a diferenças genéticas, o que favorece a eficiência da seleção. Para NN, h^2 foi de 0,6363, também indicando boa perspectiva para seleção, enquanto MSPA apresentou menor herdabilidade (0,4510), sinalizando maior influência ambiental. Estudos como os de Freitas et al. (2019) e Silva et al. (2020) corroboram esses valores, relatando que características relacionadas à arquitetura da planta geralmente apresentam $h^2 > 0,7$, enquanto as associadas à interação planta-micro-organismo, como o número de nódulos, tendem a apresentar herdabilidades moderadas.

A razão CV_g/CV_e foi superior a 1 para ALTP (1,61) e NN (1,32), indicando que a variabilidade genética supera a ambiental e favorece a seleção. Por outro lado, MSPA apresentou CV_g/CV_e de 0,91, sugerindo que a influência ambiental é mais pronunciada, conforme relatado também por Carvalho et al. (2018) em características com menor controle genético.

Quanto ao ganho genético (ΔG), NN apresentou o maior valor (72,6079), seguido por ALTP (7,5908), enquanto MSPA teve o menor (0,1149). Esses resultados demonstram que NN possui elevado potencial para seleção, alinhando-se com trabalhos anteriores que destacam a importância da variabilidade genética em características relacionadas à fixação biológica de nitrogênio para programas de melhoramento.

4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que há uma variação significativa na eficiência simbiótica entre as diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas, evidenciada pelos parâmetros de nodulação, crescimento e biomassa da soja. As estirpes BR 85, CB1809 e BR 86 destacaram-se na formação de nódulos e no desenvolvimento das plantas, reforçando sua importância como inoculantes recomendados para a indústria.

A análise genética revelou que características como número de nódulos e altura das plantas possuem alta herdabilidade e variabilidade genética, indicando potencial para seleção e melhoramento de rizóbios mais eficientes. A influência ambiental mostrou-se mais evidente na produção de biomassa, demonstrando a necessidade de considerar fatores edafoclimáticos na recomendação de estirpes para diferentes regiões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Temprano, F. J., & López-Baena, F. J. (2009) Soybean inoculation: dose, nodule occupancy ratios, and soybean yield under controlled and field conditions. *Field Crops Research*, 113(3), 352–356.
- Barcellos, F., Menna, P., Batista, J. D. S., & Hungria, M. (2006) Transferência horizontal de genes simbióticos de estirpes inoculantes de *B. japonicum* para estirpes de rizóbios nativas dos solos dos Cerrados. In Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Jornada acadêmica da Embrapa Soja. Londrina. Embrapa Soja (Vol. 2).
- Batista, K., Xavier, G. R., & Rumjanek, N. G. (2017) Rhizobia diversity and efficiency in different fertility levels of Brazilian soils. *Applied Soil Ecology*, 117–118, 89–99.
- Campo, R. J., Araujo, R. S., & Hungria, M. (2009) Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) inoculation in Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2091–2095.
- Cardoso, J. D., Gomes, D. F., Goes, K. C., Junior, N. D. S. F., Dorigo, O. F., Hungria, M., & Andrade, D. S. (2009) Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of peanut, soybean and common bean plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(8), 1760-1763.
- Carvalho, P. R., Santos, D. F., Oliveira, T. S., & Rezende, C. M. (2018) Variability and genetic gain in soybean traits under different environments. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18(1), 33–39. <https://doi.org/10.1590/1984-70332018v18n1a5>
- Carvalho, T. L. G., Ferreira, P. A. A., & Moreira, F. M. S. (2014) Adaptation of *Bradyrhizobium* strains to diverse soil conditions and

its impact on soybean nodulation. *Scientia Agricola*, 71(3), 179–188.

DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162014000300002>

- Delamuta, JRM, Menna, P., Ribeiro, RA, & Hungria, M. (2017) Filogenias de genes simbióticos de simbiontes de *Bradyrhizobium* de leguminosas de importância econômica e ambiental no Brasil dão suporte à definição dos novos simbiovares pachyrhizi e sojae. *Systematic and Applied Microbiology*, 40 (5), 254-265.
- Dill, R. E. (2022) *Bioinsumos na agricultura brasileira: Alternativa biológica para uma agricultura ambientalmente sustentável* - Mestrado Profissional em Ambiente e Sustentabilidade – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS, Unidade Hortênsias, 100p.
- Fonseca, G. G., Oliveira, D. P., Soares, B. L., Ferreira, P. A. A., Teixeira, C. M., Martins, F. A. D., ... & Andrade, M. D. (2013) Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. *Biosci J*, 29, 1778-87.
- Freitas, R. A., Silva, C. M., Oliveira, L. G., & Moreira, F. M. S. (2019) Genetic variability and adaptability of soybean nodulation under different soil conditions. *Agronomy Journal*, 111(3), 1401–1412.
- Hungria, M., & Mendes, I. C. (2015) Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 212, 1–11.
- Hungria, M., Campo, R. J., & Mendes, I. D. C. (2001) Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. (Vol. 35). Embrapa Soja; Brasília, DF: Embrapa Cerrados.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2015) Alternative methods for soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 31–38.
- Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2022). Fixação biológica do nitrogênio. In M. C. Meyer, A. de F. Bueno, S. M. Mazaro, & J. C. da Silva (Eds.), *Bioinsumos na cultura da soja* (pp. 141-162). Embrapa.

- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., ... & Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA research*, 9(6), 189-197.
- Pimentel-Gomes, F. (2023) *Curso de estatística experimental*. Digitaliza Conteúdo.
- Ramalho, M. A. P. (2005) *Experimentação em genética e melhoramento de plantas*. Ufla.
- Silva, R. R., Nogueira, R. R., Carvalho, L. F., & Teixeira, D. M. (2020) Genetic parameters and selection of soybean genotypes for plant height and grain yield. *Journal of Agricultural Science*, 12(2), 45–52.
- Soares, B. L., Ferreira, P., & Oliveira, R. S. (2006) Responses of soybean (*Glycine max* L. Merr.) to inoculation with *Bradyrhizobium* strains and nitrogen fertilization in tropical soils. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30(3), 451–457.
- Vilas Boas, R. C., & Moreira, F. M. D. S. (2012) Microbiologia do solo no ensino médio de Lavras, MG. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36, 295-306.
- Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., & Boddey, R. M. (2007) Variability in nodule efficiency of *Bradyrhizobium* strains in soybean under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 362–373.
- Zilli, J. É. Pereira, G. M. D., França Júnior, I., Silva, K. D. Hungria, M., & Rouws, J. R. C. (2013) Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. *Acta Amazonica*, 43, 153-160.