

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Aspectos Ecológicos e Funcionais do Gênero
Bradyrhizobium Associado com Cana-de-Açúcar**

Gustavo Feitosa de Matos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ASPECTOS ECOLÓGICOS E FUNCIONAIS DO GÊNERO
***Bradyrhizobium* ASSOCIADO COM CANA-DE-AÇÚCAR**

GUSTAVO FEITOSA DE MATOS

Sob a Orientação do Pesquisador
José Ivo Baldani

e Co-orientação do Pesquisador
Luc Felicianus Marie Rouws

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de Concentração: Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Março de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M425a Matos, Gustavo Feitosa de, 1991-
Aspectos ecológicos e funcionais do gênero
Bradyrhizobium associado com cana-de-açúcar / Gustavo
Feitosa de Matos. - Seropedica, 2021.
119 f.

Orientador: José Ivo Baldani.
Coorientador: Luc Felicianus Marie Rouws.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
, 2021.

1. rizóbios. 2. promoção de crescimento. 3.
gramíneas. 4. fixação biológica de nitrogênio. 5.
genômica. I. Baldani, José Ivo, 1953-, orient. II.
Felicianus Marie Rouws, Luc, 1976-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia . IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

GUSTAVO FEITOSA DE MATOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de Concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM: 29/03/2021

José Ivo Baldani. Ph.D. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

André Luiz Martinez de Oliveira. D.Sc. UEL

Jakson Leite. D.Sc. IFPA

Pedro Correa Damasceno Junior. D.Sc. UFRRJ

Willian Pereira. D.Sc. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem Ele nada seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF) e a UFRRJ pela oportunidade de realizar o Doutorado.

A FAPERJ pelo financiamento de projetos ao PPGF.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Doutorado.

Aos meus pais, Severino e Maria Amélia, e irmãos, Marilene, Karina e Mario, pelo apoio e confiança.

A minha namorada, Amanda Bergami, por estar ao meu lado e me apoiar em pontos difíceis dessa caminhada.

A Embrapa pelo suporte para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao Dr. José Ivo Baldani pela orientação e contribuição para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Dr. Luc Rouws, que me acompanhou e orientou da iniciação científica até o Doutorado. Sou muito grato por tudo que me ensinou e pela contribuição na formação profissional e pessoal, aliás, foram nove anos trabalhando juntos.

A Dra. Janaina Rouws pelo auxílio com análises estatísticas.

Aos amigos João Luiz e Karine, pelo auxílio nas análises de dados, montagem e coleta de experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana e Laboratório de Genética e Bioquímica, pelo suporte nas atividades de laboratório, análises e pelos momentos de descontração.

Aos grandes amigos Samuel Passos e Jakson Leite pelo apoio e os bons conselhos.

Aos amigos do alojamento da Rural e da Embrapa, pelo apoio e amizade.

A todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001” (**PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018 DA CAPES**).

Muito obrigado!

RESUMO GERAL

MATOS, Gustavo Feitosa. **Aspectos ecológicos e funcionais do gênero *Bradyrhizobium* associado com cana-de-açúcar.** 2021, 119p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Muitas espécies do gênero *Bradyrhizobium* têm a capacidade de se associar de forma simbiótica com plantas da família Fabaceae (leguminosas), beneficiando o crescimento vegetal pelo processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Entretanto, o gênero *Bradyrhizobium* também é encontrado em outros tipos de ambientes, frequentemente em vida livre, como na endosfera e rizosfera de plantas não leguminosas. Na cana-de-açúcar, estudos, por métodos independentes de cultivo, mostraram que o gênero *Bradyrhizobium* pode ter um papel importante no processo de FBN. A presente tese teve como objetivo compreender melhor as funções e a ecologia de *Bradyrhizobium* spp. associadas à cana-de-açúcar. A tese contém quatro capítulos de pesquisa. No primeiro, uma coleção diversa de 103 estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de cana é caracterizada por meio de duas técnicas moleculares do tipo *fingerprinting*, pela análise de sequência do gene *housekeeping recA* e pela caracterização morfocultural. No segundo capítulo, mediante uma abordagem de genômica comparativa e funcional, investiga-se fatores genéticos (*clusters* de gene *nif*) na estirpe recém descrita *Bradyrhizobium sacchari*, que se mostra atípico pela sua capacidade de fixar nitrogênio de forma mutualista com várias espécies e plantas leguminosas, mas que também apresenta a capacidade de FBN em vida livre. No capítulo III estuda-se o potencial de se usar estirpes de *Bradyrhizobium* spp. para melhorar o crescimento de plantas de cana-de-açúcar. Esses estudos foram conduzidos primeiramente em condições de casa de vegetação e, em seguida, a nível de campo. O capítulo IV trata de um aspecto mais ecológico e busca avaliar como o histórico recente de cultivo do solo (sem cultivo, com a gramínea braquiária, ou com as leguminosas amendoim e soja) influencia a comunidade bacteriana encontrada na rizosfera de cana-de-açúcar. Os resultados indicaram que há uma diversidade de grupos de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* associados à cana-de-açúcar ainda não explorados. Além disso, a análise conjunta de BOX e ERIC PCR foi capaz de agrupar eficientemente as estirpes com correspondência entre as características fenotípicas e filogenia do gene *recA*. Revelou-se a situação atípica de que *B. sacchari* possui dois *clusters* completos de genes para FBN, designados como simbiótico (SC) e não simbiótico (NSC). Análises de RT-qPCR mostraram que o nível de expressão dos dois genes *nifH* (redutase da nitrogenase) varia de acordo com as condições ambientais. Ensaio de inoculação em condições de casa de vegetação permitiram a identificação de três estirpes de *Bradyrhizobium* que afetam de forma positiva aspectos do crescimento vegetal, como tamanho do sistema radicular, conteúdo de clorofila e superfície total de folhas. Ensaio a nível de campo não foram conclusivos, mas indicaram que a inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* possuem potencial para aumentar a área foliar das plantas durante os primeiros meses de desenvolvimento. Além disso, encontrou-se que o cultivo prévio do solo com amendoim e soja aumentou a abundância de rizóbios e de alguns outros gêneros de bactérias promotoras de crescimento na rizosfera de cana-de-açúcar. Desta forma, os resultados apresentados na presente tese representam um avanço na compreensão da funcionalidade, na aplicabilidade e na ecologia de *Bradyrhizobium* spp. no cultivo de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: rizóbios, promoção de crescimento, gramíneas, fixação biológica de nitrogênio, genômica.

GENERAL ABSTRACT

MATOS, Gustavo Feitosa. **Ecological and functional study of the association of *Bradyrhizobium* strains with sugarcane.** 2021. 119p. Thesis (Doctor in Phytotechnics). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Many species of the genus *Bradyrhizobium* have the ability to associate symbiotically with plants of the Fabaceae family (legumes), benefiting plant growth through the process of biological nitrogen fixation (BNF). However, the genus *Bradyrhizobium* is also found in other types of environments, often in the free-living conditions, such as in the endosphere and rhizosphere of non-legume plants. In sugarcane, independent cultivation methods have shown that the genus *Bradyrhizobium* can play an important role in the BNF process. This thesis aimed to better understand the functions and ecology of *Bradyrhizobium* spp. associated with sugarcane. The thesis contains four research chapters. In the first, a diverse collection of 103 strains of *Bradyrhizobium* spp. from sugarcane is characterized by means of two molecular fingerprinting techniques, by sequence analysis of the *recA* housekeeping gene and by morphocultural characteristics. In the second chapter, using a comparative and functional genomics approach, we investigate genetic factors (*nif* gene clusters) in the recently described strain *Bradyrhizobium sacchari*, which is atypical for its ability to fix nitrogen in a mutualistic way with various species and leguminous plants, but which also has the ability of free-living BNF. In chapter III, it was studied the potential of using strains of *Bradyrhizobium* spp. to improve the growth of sugarcane plants. These studies were conducted first under greenhouse conditions and then at field level. Chapter IV deals with a more ecological aspect and seeks to assess how the recent history of soil cultivation (uncultivated, with *Brachiaria* grass, or with leguminous peanuts and soybeans) influences the bacterial community found in the sugarcane rhizosphere. The results indicated that there is a diversity of bacterial groups of the genus *Bradyrhizobium* associated with sugarcane that have not been explored yet. Furthermore, joint analysis of BOX and ERIC PCR was able to efficiently group the strains with correspondence between the phenotypic characteristics and phylogeny of the *recA* gene. The atypical situation was revealed that *B. sacchari* possesses two complete clusters of genes for BNF, designated as symbiotic (SC) and non-symbiotic (NSC). RT-qPCR analysis showed that the expression level of the two *nifH* genes (nitrogenase reductase) varies according to environmental conditions. Inoculation tests under greenhouse conditions allowed the identification of three *Bradyrhizobium* strains that positively affect aspects of plant growth, such as root system size, chlorophyll content and total leaf surface. Field-level trials were inconclusive but indicated that inoculation of *Bradyrhizobium* strains has the potential to increase plant leaf area during the first few months of development. Furthermore, it was found that previous soil cultivation with peanuts and soybeans increased the abundance of rhizobia and some other genera of growth-promoting bacteria in the sugarcane rhizosphere. Thus, the results presented in this thesis represent an advance in the understanding of the functionality, applicability and ecology of *Bradyrhizobium* spp. in the cultivation of sugar cane.

Key words: rhizobia, growth promotion, grasses, biological nitrogen fixation, genomics.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfo-culturais de colônias puras de estirpes tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes foram agrupadas de acordo com semelhanças observadas e divididas em grupos fenotípicos seguindo a nomenclatura do agrupamento feito por Avontuur et al. (2019). 20

Figura 2. Dendrograma (UPGMA) de similaridade genética construído pela análise conjunta dos perfis polimórficos obtidos por BOX e ERIC-PCR de diferentes isolados de *Bradyrhizobium* spp. obtidos de raízes de cana-de-açúcar. Grupos formados de A-S representam uma linha de corte a 70% de similaridade. Tipos de *recA* de I-VII foram definidos após análise filogenética deste gene nos representantes dos grupos (Figura 3). Tipo de morfologia de colônia foi obtida por caracterização de acordo com a figura 1. 22

Figura 3. Análise filogenética do gene *recA* de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. obtidas de raízes de cana-de-açúcar e espécies tipo desse gênero. Filograma Neighbor-Joining (NJ) estimado a partir de 410 posições de pares de bases. Valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore NJ foi obtida utilizando o modelo de Kimura 2-parameter, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA 7. A análise envolveu 110 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminadas previamente à análise. *Bradyrhizobium lupini* HPC(L) (AMQQ00000000) foi utilizada como grupo externo. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Alguns clados colapsados são representados com as letras A a D e as respectivas estirpes podem ser encontradas no Anexo 3. Número de acesso das espécies tipo estão no Anexo 3. 25

Figura 4. Relações filogenéticas de estirpes de *Bradyrhizobium*. Filograma estimado pelo método Neighbor-Joining (NJ) a partir de 5387 posições de pares de bases dos genes concatenados *recA* (1076), *glnII* (1010), *dnaK* (1881) e *atpD* (1420). Os valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudoreplicados. A árvore NJ foi obtida usando o modelo de Kimura 2-parameter. As estirpes com duas cópias do gene *nifH* são mostradas em negrito e as estirpes testadas quanto à atividade da nitrogenase em condição de vida livre estão marcadas (*). A barra de escala representa o número de substituições de pares de bases por local. As análises foram conduzidas em MEGA7. 38

Figura 5. Organização de clusters de genes de fixação de nitrogênio em estirpes representantes e espécies de supergrupos *B. japonicum* e fotossintéticos. Os genomas foram anotados usando RAST e a organização do gene foi estudada usando Artemis. Os genes *nifHDKV* são codificados por cores para facilitar a visualização comparativa. Clusters de genes *nif* simbióticos (SC) ou não simbióticos (NSC) de acordo com a Anexo 4. Para *B. sacchari*, foi utilizado o genoma da estirpe BR 10556. A interrupção das linhas horizontais significa que os genes estão em contigs separados. 40

Figura 6. Relações filogenéticas de todos os genes *nifH* identificados em sequências de genoma disponíveis de estirpes de *Bradyrhizobium*. Filograma estimado pelo método de Maximum

Likelihood (ML) a partir de 868 posições de pares de bases. Os valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudoreplicados. A árvore ML foi obtida usando o modelo Tamura de 3 parâmetros. A barra de escala representa o número de substituições de par de bases por site. *Rhizobium etli* CFN 42T (NC_004041) foi usado como grupo externo. Nomes em negrito e da mesma cor representam homólogos *nifH* da mesma linhagem. Alguns cladogramas colapsados são representados com as letras A a F e as respectivas estirpes podem ser encontradas no Anexo 1. As análises foram conduzidas no Mega 7.....45

Figura 7. Atividade da nitrogenase de vida livre de diversas estirpes de *Bradyrhizobium* portadoras ou não de um NSC. As estirpes foram cultivadas em meio JMV semissólido modificado e a atividade da nitrogenase foi avaliada pelo ensaio de redução do acetileno sete dias após a inoculação. A atividade da nitrogenase foi medida como nmol de C₂H₄ produzido a partir de gás acetileno por hora por frasco. Estirpes portadoras de um NSC: *Bradyrhizobium* sp. AG48, *Bradyrhizobium* sp. Btai1, *B. oligotrophicum* S58^T e *B. sacchari* BR 10280^T. Estirpes carregando apenas um SC: *B. stylosanthis* BR 446^T, *B. yuanmingense* BR3267, *B. centrolobii* BR 10245^T, *B. neotropicae* BR 10247^T e *B. huanghaiense* CGMCC 1.10948^T. Barras indicam erro padrão, n = 3.....45

Figura 8. Imagens de géis de agarose 2% com amostras de RNA extraídos de cultura crescida em condição de FNVL (A) e simbiose (B). 1 a 3- amostras de meio semissólido; 4 a 6- amostras de nódulos.....46

Figura 9. Expressão relativa dos homólogos dos genes *nifH* e *nifD* dos NSC e SC de *Bradyrhizobium sacchari* BR10280^T durante o crescimento sob condições FLNF (em meio JMV semi-sólido) ou sob condições FN simbiótica (dentro de nódulos ativos de *Vigna unguiculata*). Os níveis de transcrição foram quantificados usando RT-qPCR com primers específicos dos genes e cDNA produzido usando primers hexaméricos aleatórios. Foi utilizado o método do limiar comparativo ($\Delta\Delta C_t$) e o gene *rpoD* foi utilizado como referência. Os resultados são baseados em valores médios de duas duplicatas técnicas e as barras indicam o erro padrão (SE) para três repetições biológicas (n = 3).48

Figura 10. Precipitação mensal registrada sob a área de estudo entre outubro de 2018 e agosto de 2020. (Dados do INMET-Instituto Nacional De Meteorologia Do Brasil).57

Figura 11. Comprimento de parte aérea de plantas de cana-de-açúcar cv. RB867515 inoculadas ou não (tratamentos N80 e N40) transplantadas para vasos com solo sob condições de casa de vegetação. No 0DAT (dias após transplantio) equivale ao comprimento das mudas no dia do transplantio para os vasos (28 dias após a inoculação). Todos os tratamentos tiveram 8 repetições em bloco ao acaso. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Scott knot, p <0,05) entre as médias de tratamento, para cada ponto de tempo. DAT – dias após transplantio.61

Figura 12. Teor de nitrogênio nas folhas de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 30 DAT em experimento de casa de vegetação em vasos com solo. Teste de média Scott Knot a 5%. 63

- Figura 13. Brotamento de minitoletes de cana-de-açúcar cv. RB867515 inoculados ou não e plantados em substrato composto de mistura de areia e vermiculita (2:1). Todos os tratamentos tiveram 10 repetições em bloco ao acaso. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Scott Knot, $p < 0,1$) entre as médias dos tratamentos, para cada tempo de avaliação. DAP – dias após plantio..... 65
- Figura 14. Comprimento da parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 45 e 85 dias após o transplântio (DAT) de mudas inoculadas ou não (tratamentos N40 e N80) para o campo. Cada tratamento consistiu de cinco repetições. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indica diferença significativa (LSD, $p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos..... 66
- Figura 15. Área foliar de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 45 e 85 dias após o transplântio (DAT) de mudas inoculadas ou não (tratamentos N40 e N80) para o campo. Cada tratamento consistiu de cinco repetições. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indica diferença significativa (LSD, $p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos. 67
- Figura 16. Esquema experimental do ensaio de rotação de cultura de cana-de-açúcar em vasos de 10 L com solo Cambissolo flúvico coletado de canavial organizados em blocos casualizados (B1; B2; B3; B4 e B5) com cinco repetições. Na Etapa 1 foram cultivadas por 120 dias culturas que antecederam a cana-de-açúcar (amendoim, soja e braquiária) ou desixado em pousio sem cultivo. A Etapa 2 seguiu com o plantio de mudas de cana-de-açúcar nos mesmos vasos após coleta de amostras e incorporação dos restos vegetais ao solo..... 75
- Figura 17. Experimento rotação de cultura com amendoim, braquiária e soja e pousio sem cultivo, aos 120 dias após plantio. As plantas foram trituradas e retornadas aos seus respectivos vasos para remobilização de nutrientes por 30 dias. 76
- Figura 18. Comprimento da parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 30 dias após o plantio em vasos que tiveram amendoim, braquiária, soja ou sem cultivo anteriormente. Teste scot-knot em $p < 0,05$ 78
- Figura 19. Massa seca da parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 30 dias após o plantio em vasos que tiveram amendoim, braquiária, soja ou sem cultivo (pousio) anteriormente. Teste Skott Knott em $p < 0,05$ 79
- Figura 20. Curvas de rarefação para riqueza de espécies (ASVs) em função do tamanho da amostra de sequência total em amostras de solo oriundo de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (SemCultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e SemCultivo_Cana). 80
- Figura 21. Diversidade alfa utilizando índice de Shannon para visualização da diversidade de espécies em amostras de solo oriundas de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (SemCultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e SemCultivo_Cana). Figura elaborada por Luc Rouws. 81

Figura 22. Abundância relativa de sequências baseadas no gene 16S rRNA de gêneros mais abundantes em amostra de solo oriundo de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (SemCultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e SemCultivo_Cana). Figura elaborada por Luc Rouws. 81

Figura 23. Abundância relativa de sequências baseadas no gene 16S rRNA de amostra de solo oriundo de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (SemCultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e SemCultivo_Cana): (A) abundância relativa ASVs de rizóbios; e (B) para ASVs de *Bradyrhizobium*. Figura elaborado por Luc Rouws. 82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Primers específicos desenhados a partir do genoma da estirpe BR 10280 ^T	35
Tabela 2. Características de cluster de genes <i>nif</i> em estirpes representativas selecionadas de supergrupos de <i>B. japonicum</i> e fotossintéticos.....	41
Tabela 3. Estimativas de divergência evolutiva entre sequências de cópia do gene <i>nifH</i> presentes em estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>	42
Tabela 4. Leitura em fluorímetro Qubit® em ng/μL do RNA total extraído das amostras coletadas nos três experimentos usados para estudo de expressão genica em diferentes estilos de vida de <i>Bradyrhizobium sacchari</i> BR 10280.....	46
Tabela 5. Valores de eficiência (E), slope e coeficiente de determinação (R ²) dos primers específicos para genes da estirpe BR 10280 ^T utilizado em experimento de qPCR.....	47
Tabela 6. Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> selecionadas como representantes de grupos genéticos e utilizadas em experimento de inoculação em cana-de-açúcar, sob condições de casa de vegetação em vasos com solo não esterilizado.....	55
Tabela 7. Características químicas do solo da área experimental. (Campo Experimental – Embrapa Agrobiologia).	57
Tabela 8. Estirpes que apresentaram efeito promotor de crescimento em cana-de-açúcar em experimento de casa de vegetação.....	58
Tabela 9. Variáveis analisadas de cana-de-açúcar cv. RB867515 inoculada, em casa de vegetação, aos 30 dias após o transplante para vasos com solo. (AF) área foliar. (DC) diâmetro do colmo. (CFL) clorofila. (MPAF) massa parte aérea fresca. (MPAS) massa parte aérea seca. (MRS) massa de raiz seca. (MSF) massa fresca de raiz. (VL) volume de raiz.	62
Tabela 10. Dados de produção parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515, inoculada ou não, primeira soqueira. Grau Brix, Produção do Colmo (PC) e Massa Seca da Parte Aérea (colmo, folha e palha – MSPA).	68
Tabela 11. Concentração de nutrientes baseada em análise química da folha +3 da primeira soqueira de cana-de-açúcar cv. RB867515, inoculada ou não, cultivada na área experimental da Embrapa Agrobiologia. Médias seguidas de letras distintas, para cada variável, diferem entre si no teste t (LSD) em p<0,05. EP ± - valor de erro padrão de cada média.	69
Tabela 12. Análise de solo utilizado no experimento de rotação de cultura coletado na área experimental da UFRRJ em Campos dos Goytacazes-RJ.	76
Tabela 14. Análise química de amostras de solo coletada dos vasos após 120 dias do plantio de soja, braquiária, amendoim ou pousio (Etapa 1) e de amostras coletada 30 dias após plantio de cana-de-açúcar cv. RB867515 (Etapa2).	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Cana-de-Açúcar.....	5
2.2. Estudos de Colonização de Cana-de-açúcar por Bactérias Endofíticas	5
2.3. Promoção de Crescimento em Cana-de-açúcar.....	6
2.4. Gênero <i>Bradyrhizobium</i>	7
2.5. Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-Açúcar e Métodos Para Sua Quantificação.....	8
2.6. Associação entre <i>Bradyrhizobium</i> e Plantas Não-Leguminosas de Interesse Agrônômico	10
2.7. Rizóbios e Fixação de Nitrogenio em Vida Livre	10
2.8. Rotação de Culturas no Cultivo de Cana-de-Açúcar.....	11
3 CAPITULO I	13
3.1. RESUMO	14
3.2. ABSTRACT	15
3.3. INTRODUÇÃO.....	16
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.4.1. Estirpes e Meio de Cultura.....	18
3.4.2. Caracterização Morfocultural.....	18
3.4.3. Caracterização De Fingerprint	18
3.4.4. Amplificação e Sequenciamento do Gene <i>recA</i>	19
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.5.1 Morfologia de Colônia	20
3.5.2 Análise Genômica	21
3.5.3 Análise Filogenética do Gene <i>recA</i>	23
3.6 CONCLUSÃO.....	26
4 CAPÍTULO II	27
4.1 RESUMO	28
4.2 ABSTRACT	29
4.3 INTRODUÇÃO	30
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.4.1 Estirpes de Bactérias e Meios de Cultura.....	32
4.4.2 Extração e Sequenciamento de DNA das Estirpes AG48 e M12.....	32
4.4.3 Anotação de Genoma e Organização de Cluster de Genes <i>nif</i>	32
4.4.4 Análise Filogenética.....	33
4.4.5 Ensaios de Redução de Acetileno (ARA)	33
4.4.6 Expressão de Genes <i>nifH</i> e <i>nifD</i> em <i>Bradyrhizobium sacchari</i> BR 10280 ^T	33
4.4.7 Transcrição Reversa e PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	35
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.5.1 Genes de Fixação Biológica de Nitrogênio e Clusters de Genes <i>nif</i> Simbióticos e Não Simbióticos.....	37
4.5.2 Filogenia do Gene <i>nifH</i>	42
4.5.3 Atividade da Nitrogenase	45

4.5.4 Extração de RNA e Obtenção do cDNA	46
4.5.5 Curva Padrão dos Primers	46
4.5.6 Expressão Relativa de Genes <i>nif</i> em Diferentes Estilos de Vida	47
4.6 CONCLUSÕES	49
5 CAPÍTULO III	50
5.1 RESUMO	51
5.2 ABSTRACT	52
5.3 INTRODUÇÃO	53
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	54
5.2.1 Etapas Comuns Para Experimento de Casa de Vegetação e Campo	54
5.2.2 Seleção de Estirpes Eficientes na Promoção de Crescimento de Cana-de-Açúcar em Casa de Vegetação	54
5.2.3 Experimento em Campo	56
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.3.1 Seleção de Estirpes em Casa-de-Vegetação para Instalação de Experimento de Campo	60
5.3.2 Experimento de Campo	64
5.4 CONCLUSÕES	70
6 CAPITULO IV	71
6.1 RESUMO	72
6.2 ABSTRACT	73
6.3 INTRODUÇÃO	74
6.4 MATERIAL E MÉTODOS	75
6.4.1 Delineamento Experimental	75
6.4.2 Extração de DNA	77
6.4.3 Sequenciamento	77
6.4.4 Análise de dados e estatística	78
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.5.1 Crescimento da Cana-de-Açúcar e Fertilidade do Solo Após Coletas	78
6.5.2 Composição Microbiana	79
6.6 CONCLUSÃO	86
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9. ANEXOS	106

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das culturas de maior importância econômica do Brasil, com uma produção estimada para safra 2020/2021 em 642,1 milhões de toneladas (CONAB, 2020), o que torna o país o maior produtor e exportador de açúcar do mundo. Entretanto, o aumento na produção da cana-de-açúcar no Brasil tem dependido apenas do incremento de novas áreas de produção, geralmente com solos de baixa fertilidade, sem que haja alterações significativas na produtividade (CONAB, 2015). Essa cultura apresenta baixa resposta a adubação nitrogenada, principalmente na cana planta, e portanto recebe baixa aplicação de fertilizante nitrogenado (N) (NUNES JUNIOR et al., 2005). Sabe-se que aproximadamente 50% do N aplicado na forma de fertilizante nitrogenado é perdido por lixiviação na forma de nitrato (NO_3) (SPATZAL, 2015). Portanto, somente parte é efetivamente utilizado pela cultura.

A necessidade de baixa aplicação de N fertilizante na cultura de cana-de-açúcar pode ser um indicativo de que esteja ocorrendo uma contribuição do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), por meio da associação com bactérias diazotróficas conforme foi demonstrada em vários estudos utilizando as técnicas de diluição isotópica de ^{15}N (RUSCHEL et al., 1975; LIMA et al., 1987; URQUIAGA et al., 1992; URQUIAGA et al., 2012; PEREIRA et al., 2020). Em outros casos, foi verificado o crescimento e acúmulo de N nas plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas em valores similares ao tratamento adubado com nitrogênio (BARRETO et al., 2019; SCHULTZ et al., 2012). Entretanto, a FBN não é o único mecanismo que pode favorecer o desenvolvimento da cana-de-açúcar, pelas bactérias endofíticas, nessas áreas de baixa fertilidade; podem haver outros mecanismos atuando simultaneamente, tais como a síntese de substâncias promotoras do crescimento, incluindo fitohormônios como auxinas e ácidos giberélicos e a solubilização de minerais como o fósforo inorgânico (WANG et al., 1993; RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 2001; FERRARA et al., 2012; KLEINGESINDS et al., 2018; FERREIRA et al., 2020).

Os benefícios provenientes da associação de bactérias com a cultura da cana-de-açúcar levaram ao isolamento de microrganismos com potencial para aplicação como produtos biotecnológicos, como por exemplo as cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas selecionadas para a cultura de cana-de-açúcar (REIS et al., 2009). Embora a inoculação com a mistura dessas estirpes tenha efeitos benéficos no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar, estudos com ^{15}N indicaram que a FBN não foi responsável pelo efeito observado (SCHULTZ et al., 2017).

Estudo mostrou que o gênero *Bradyrhizobium* também pode estar envolvido com o processo de FBN na cana-de-açúcar (FISCHER et al., 2012). Esse gênero é composto por bactérias versáteis e diversificadas quanto ao meio em que vive, porém é mais bem conhecido pela capacidade de muitas de suas espécies estabelecerem relações simbióticas com as plantas leguminosas (família Fabaceae). Por causa dessa relação simbiótica com as plantas leguminosas, a maioria das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. foram isoladas de nódulos radiculares, resultando em poucos relatos de sua exploração no solo e de suas funções quando em associação com plantas não leguminosas. Diante da possível importância do processo de FBN desse gênero para a cultura de cana-de-açúcar, novas abordagens de isolamento foram aplicadas e permitiram a formação de uma coleção, bastante diversa. Esta coleção está composta por estirpes pertencentes à espécies com capacidade de associação simbiótica com plantas leguminosas, e outras sem capacidade de associação simbiótica (ROUWS et al., 2014). Algumas dessas estirpes apresentaram atividade de nitrogenase em condições de vida livre e

foram capazes de promover o crescimento de cana-de-açúcar em experimento de inoculação em casa de vegetação (DE MATOS et al., 2017; ROUWS et al., 2014).

A compreensão da evolução e das diferenças genéticas que ocorrem no gênero *Bradyrhizobium*, que as capacitam a exercerem o processo de FBN em vida livre e em simbiose, pode resultar em uma alternativa interessante de uso de uma mesma estirpe de *Bradyrhizobium* na inoculação de plantas leguminosas e de cana-de-açúcar, como um inoculante de dupla aptidão, aumentando, por exemplo, os benefícios da prática de rotação de culturas. A rotação de culturas tem-se tornado uma prática bastante comum na cultura canavieira por aumentar a sua produtividade e reduzir problemas de ordem fitossanitária (AMBROSANO et al., 2011). Frequentemente, culturas leguminosas, como amendoim ou soja, são utilizadas para essa finalidade. Essa prática também é capaz de afetar a ecologia de rizóbios (e de microrganismos de uma forma geral) em plantações de cana-de-açúcar, podendo essa informação ser usada para otimizar as práticas de manejo e um melhor direcionamento nas abordagens de isolamento e caracterizações de novas estirpes promotoras de crescimento.

A busca por estirpes microbianas que possam ser utilizadas como promotoras do crescimento vegetal normalmente inicia-se com a prospecção de uma coleção de isolados obtidos de várias fontes (ROUWS et al., 2014; OO et al., 2020). A presença de isolados 'redundantes' em uma coleção aumenta o esforço de trabalho, deixando-o lento e oneroso, inclusive podendo limitar o número de testes a serem realizados. Diante disso, identificar um padrão de diferenciação consistente entre as características morfoculturais, genéticas e filogenéticas de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. que possa ser utilizado para orientar na identificação e seleção de estirpes, pode se tornar uma ferramenta de grande utilidade na busca por grupos de *Bradyrhizobium* em ambiente não nodular.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo geral compreender melhor aspectos funcionais e ecológicos e a aplicabilidade na forma de inoculante de rizóbios isolados de cultivo de cana-de-açúcar. A hipótese central da Tese é que (Brady)rhizóbios naturalmente associados a cana-de-açúcar têm potencial para incrementar o crescimento dessa cultura mediante a FBN ou outros mecanismos de promoção de crescimento e, que essas bactérias estão geneticamente adaptadas a condições dinâmicas de solo onde hospedeiros do tipo leguminosas estão ocasionalmente presentes, como é o caso em sistemas de produção usando a prática de rotação de culturas.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Classificar uma coleção diversa de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* obtida de raízes de cana-de-açúcar com base em características fenotípicas e filogenéticas e identificar correlações entre esses tipos de características.
- ✓ Conhecer o conteúdo dos genes de fixação biológica de nitrogênio (*nif*) de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de cana-de-açúcar em relação às suas capacidades de fixar nitrogênio em simbiose e/ou vida livre utilizando uma abordagem combinada de genômica estrutural, comparativa e funcional;
- ✓ Identificar estirpes do gênero *Bradyrhizobium* que possam atuar na promoção de crescimento da cana-de-açúcar em condições controladas e de campo;
- ✓ Compreender como o cultivo prévio de brachiaria, soja ou amendoim, comumente usadas em sistemas de rotação, pode afetar a composição bacteriana associada às raízes de cana-de-açúcar, com ênfase nos rizóbios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L. É uma planta alógama pertencente à família *Poaceae*. Sua classificação de acordo com Cronquist (1988) é: Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Poales*, Família *Poaceae*, Sub-família *Panicoideae*, Tribo *Andropogoneae*, Sub-tribo *Saccharinae*, Gênero *Saccharum*. Como exemplos de espécies desse gênero podem ser citadas: *Saccharum officinarum*; *Saccharum spontaneum*; *Saccharum sinense*; *Saccharum barberi*; *Saccharum robustum*; *Saccharum edule*, *Saccharum villosum* e *Saccharum asperum* (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; MENDES, 2015).

A cana-de-açúcar teve sua origem muito provavelmente no Sudeste da Ásia nas regiões compreendidas entre Indonésia e Nova Guiné (MENDES, 2015). As primeiras mudas chegaram ao Brasil por volta de 1515, vindas da ilha da Madeira (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A cana-de-açúcar foi efetivamente cultivada para comercialização por volta de 1532 (FIGUEIREDO, 2008). Essa cultura pode ser cultivada em regiões de clima temperado e tropical e em uma grande diversidade de solos (ANTUNES, 2016). Desde o início de sua comercialização, a cana-de-açúcar passou por grandes mudanças, com destaque para o melhoramento genético, visando a obtenção de um produto de maior eficiência produtiva (LANDELL & BRESSIANI, 2008).

Segundo Daros et al. (2015), a cultivar RB867515 é a mais cultivada no Brasil, apresenta hábito de crescimento ereto e se espalha facilmente. Seu perfilhamento é médio com colmos de diâmetro médio e alta uniformidade. A zona radicular é de largura média, sem raízes aéreas. As folhas são de largura média, arqueadas, curvas e bordos com serrilhamento pouco agressivo. Apresenta melhor desempenho em solos de textura leve e fertilidade média. Possui boa capacidade de brotação mesmo em plantio tardio sob baixas temperaturas. Em cana planta, no plantio de ano e meio, pode ocorrer tombamento ao final do ciclo devido à crescimento vigoroso. Seu sucesso no Brasil resulta especialmente pelo fato de permitir a expansão da área de cultivo em solos de baixa fertilidade, arenosos e com restrições hídricas, cenário onde outras variedades não tem apresentado o mesmo desempenho. A RB867515 apresenta suscetibilidade à estria vermelha, o que a classifica como média no quesito de sanidade vegetal.

2.2. Estudos de Colonização de Cana-de-açúcar por Bactérias Endofíticas

Um dos primeiros estudos mostrando infecção e localização de bactérias endofíticas nos tecidos internos de cana-de-açúcar foi realizado por microscopia eletrônica aplicada em plantas micropropagadas previamente inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (JAMES et al., 1994). Com os avanços obtidos nas técnicas de biologia molecular, outros estudos foram realizados e mostraram a localização de bactérias diazotróficas endofíticas promotoras de crescimento no interior dos tecidos de plantas da família *Poaceae*, incluindo a cana-de-açúcar, por meio do uso de genes repórteres (ROUWS et al., 2010; SINGH et al., 2020; WANG et al., 2020).

A utilização da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (sigla em inglês, FISH) combinada com abordagem de cultivo, também, permitiu o estudo de colonização de plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com combinações de misturas de bactérias diazotróficas endofíticas, além de possibilitar a quantificação das estirpes inoculadas (OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, a falta de um método eficaz, barato e rápido para localizar, contar e avaliar a atividade dessas bactérias quando inoculadas, dificulta o rastreamento no interior do tecido vegetal, assim como determinar o mecanismo promotor de crescimento exercido na planta (RILLING et al., 2019).

2.3. Promoção de Crescimento em Cana-de-açúcar

A interação benéfica entre plantas e bactérias mais conhecida e estudada é a interação simbiótica entre plantas da família Fabaceae (leguminosas) e os rizóbios (termo que abrange as bactérias capazes de induzir a formação de nódulos em leguminosas). Nestas interações, a planta forma uma estrutura especializada (nódulo) para hospedar bactérias que fixam nitrogênio atmosférico em benefício da planta, enquanto a bactéria recebe os compostos fotossintetizados (OLDROYD et al., 2011).

Os rizóbios fazem parte de um grupo parafilético da classe alfa e betaproteobacteria que pertencem a gêneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (alfaproteobacteria) e *Paraburkholderia* (betaproteobacteria), por exemplo. Além dos rizóbios existe uma grande variedade de bactérias associadas às plantas que, mesmo não formando estruturas especializadas como os nódulos, desempenham funções importantes. Essas bactérias ocorrem na proximidade das plantas, por exemplo, na rizosfera, no rizoplane (superfície da raiz), filoplane (superfície das folhas) ou ainda nos tecidos internos, sendo esse último grupo de microrganismos conhecidos como endofíticos (BALDANI et al., 1997). As bactérias que são benéficas para as plantas são conhecidas na literatura como, “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCP) ou “*plant growth-promoting bacteria*” (PGPB), em inglês.

A utilização de BPCP representa uma estratégia sustentável importante na produção agrícola, uma vez que cresce a diligência por insumos que possibilitem a diminuição da aplicação de fertilizantes químicos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Dentro do grupo das BPCP encontram-se as denominadas diazotróficas endofíticas, reportando-se à capacidade de alguns diazotróficos em colonizarem o interior de plantas e em associação a elas, fixarem nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER, 1992). Assim, como existem, também, muitas espécies de BPCP endofíticas que não são diazotróficas e usam outros mecanismos promotores de crescimento vegetal (SANTOYO et al., 2016).

Embora as bactérias endofíticas invadam os tecidos vegetais, elas são diferentes das endossimbiontes. Uma das diferenças é de que não induzem a formação de qualquer estrutura diferenciada na planta (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Mesmo assim, algumas bactérias endofíticas também podem apresentar capacidade de induzir a formação de nódulos simbióticos fixadores de N em Fabaceae (PIROMYOU et al., 2015; ROUWS et al., 2014).

Microrganismos endofíticos são promissores para aumentar a produtividade das culturas, remover contaminantes, inibir patógenos e fixar nitrogênio (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; KUMAR & DUBEY, 2020). Em contraste com sua capacidade em comum de fixar N₂ do ambiente, bactérias endofíticas diazotróficas associativas são geneticamente diversas. Elas são identificadas em vários gêneros de alfa-beta e gama-proteobactérias incluindo *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Paraburkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (BALDANI et al., 1986; CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988; KENNEDY et al., 2004; VESSEY, 2003; MAGNANI et al., 2010; SANTI et al., 2013; ROUWS et al., 2014).

Bactérias endofíticas diazotróficas associativas estão presentes nas raízes, colmos e folhas das plantas (YOON et al., 2016). A inoculação com microrganismos endofíticos é importante para diversas culturas com importância econômica tais como, o arroz, cana-de-açúcar e trigo, pois esta prática pode reduzir a entrada de fertilizantes nitrogenados na cultura (BALDANI et al., 2000; GOVINDARAJAN et al., 2006; MATTHEWS, 2001; SALEH et al., 2001; YANNI et al., 1997). Para a cana-de-açúcar, as maiores contribuições de FBN foram encontradas quando essa cultura foi inoculada com bactérias diazotróficas endofíticas e cultivadas em solos de baixa fertilidade (DE OLIVEIRA et al., 2006) e quando o N e estoque de carbono disponível no solo foram se exaurindo ao longo das colheitas (SCHULTZ et al., 2016).

Diversos trabalhos têm mostrado o potencial de diversas estirpes em aumentar o crescimento de cana-de-açúcar por meio da produção de fitohormônios (BASTIÁN et al., 1998; DA SILVEIRA et al., 2019). A estirpe BR 10268 do gênero *Rhizobium*, por exemplo, foi capaz de acelerar o brotamento de cana-de-açúcar por meio da produção de giberelina e aumentar o crescimento da parte aérea durante o seu desenvolvimento inicial (FERREIRA et al., 2020).

2.4. Gênero *Bradyrhizobium*

O primeiro relato de isolamento de bactérias a partir de nódulos de raízes de plantas da família Fabaceae (antiga Leguminosae) ocorreu no final do século XIX. Logo foi comprovado que essas bactérias eram responsáveis pelo fornecimento de nitrogênio atmosférico para suas plantas hospedeiras. Essas bactérias foram inicialmente nomeadas de *Bacillus radicola* (BEIJERINCK, 1888), mais tarde reclassificadas para o gênero *Rhizobium*, sendo todas representadas por apenas uma espécie, *R. leguminosarum* (FRANK, 1889).

O gênero *Rhizobium* representou todas as bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas por muito tempo, especificamente até a década de 1980. A classificação e divisão das espécies se dava praticamente pelas estirpes que induziam nodulação nos mesmos gêneros de plantas, sendo muitas vezes atribuído ao gênero da planta o nome da nova espécie de *Rhizobium*. Até então esse gênero incluía seis espécies: *R. leguminosarum* (induzem nodulação em *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* e *Lens*), *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago* e *Trigonella*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*), *R. lupini* (*Lupinus*) e *R. japonicum* (*Glycine max*). Então em 1982, com os avanços nos estudos de taxonomia dos rizóbios, um gênero composto por seis espécies foi reclassificado em seis novos gêneros e 28 espécies (ZAKHIA & DE LAJUDIE, 2001). Para incluir os isolados que possuíam crescimento lento, foi criado o gênero *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982a).

Durante muito tempo o gênero *Bradyrhizobium* foi representado somente pela espécie *B. japonicum* (JORDAN, 1982b), o que durou até a criação de um novo taxa para abrigar a espécie *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992) na década de 90. Com o passar dos anos novas espécies foram descritas nesse gênero, como por exemplo: *B. liaoningense* (XU et al., 1995), *B. yuanmingense* (YAO et al., 2002), *B. betae* (RIVAS et al., 2004) e *B. canariense* (VINUESA et al., 2005). Esse avanço na reclassificação de gêneros e espécies se deu pela aplicação de análises genômicas, incluindo a comparação da sequência do gene 16S rRNA, que é um marcador genético universal. Entretanto, o uso do 16S rRNA para descrição de novas espécies de *Bradyrhizobium* apresenta algumas limitações. Uma delas foi a demonstração de que os genomas bacterianos podem conter várias sequências de 16S rRNA que podem diferir muito entre si (ACINAS et al., 2004). Outro ponto, que afeta particularmente os rizóbios, é a capacidade de transferência horizontal e recombinação genética e isso pode fornecer filogenias distorcidas dentro desse grupo de bactérias (COENYE et al., 2005; VAN BERKUM et al., 2003). Além disso, o gene 16S rRNA possui alto grau de conservação entre os membros de *Bradyrhizobium*, o que dificulta uma diferenciação entre espécies e/ou estirpes filogeneticamente próximas (WILLEMS, 2006). Com vistas as suas limitações, começou-se a usar, por exemplo, as regiões do espaçador transcrito interno 16S-23S rRNA (ITS), que mostrou resultados coerentes com o grau de semelhança genética entre combinações de DNA genômico entre as espécies de *Bradyrhizobium* (WILLEMS et al., 2003). Entretanto, algumas estirpes de grupos específicos de *Bradyrhizobium* possuem múltiplos *operons* de rRNA em seu genoma, que resulta em várias regiões de ITS, muitas vezes com tamanho e sequências distintas, o que prejudica o seu uso em análise (WILLEMS et al., 2003). Outro fator problemático de descrição de espécies dentro do gênero *Bradyrhizobium*, é o crescimento muito lento dessas estirpes, que prejudica o uso de testes fenotípicos padronizados (como o Biolog e API systems) (WILLEMS et al., 2001).

Com isso, as análises filogenéticas devem ser complementadas com outros genes codificadores de proteínas que possuem funções essenciais para manutenção da célula, denominados de genes *housekeeping*. Esses genes possuem origem evolutiva comum e podem ser encontrados em qualquer organismo (MARCELLETTI et al., 2010). A análise combinada de genes *housekeeping* é conhecida como análise de sequência multilocus (MLSA, no inglês). A MLSA melhorou a eficiência na distinção entre espécies próximas (DELAMUTA et al., 2013). Mesmo com a evolução de ferramentas moleculares para apoiar a descrição taxonômica de estirpes, ainda é necessário uma descrição que mostre claramente características genéticas e fenotípicas quando se está caracterizando uma nova espécie de bactéria (TINDALL et al., 2010). Para esse tipo de estudo, são consideradas as características genéticas, químicas, metabólicas e fenotípicas, através de métodos padronizados abrangidos pela definição de táxons em espécies específicas (ROSSELLÓ-MÓRA, 2012; TINDALL et al., 2010). Assim, com a evolução de métodos moleculares e uso de banco de dados para comparações, a descrição de novas espécies, inclusive de *Bradyrhizobium*, passou a ser muito mais eficiente. Atualmente o gênero é composto por 69 espécies cadastradas no List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) (<http://www.bacterio.net/bradyrhizobium.html>) (visualizado em 19 de outubro de 2020).

2.5. Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-Açúcar e Métodos Para Sua Quantificação

O nitrogênio (N) é o macronutriente de maior requerimento pela maioria das culturas, estando presente nos aminoácidos, nas proteínas, nas enzimas, DNA, RNA e na clorofila (LEGHARI et al., 2016). Por isso, o N é um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal e, conseqüentemente, produtividade agrícola, principalmente para países de clima tropical, representando um alto custo para os produtores (ROBERTSON & VITOUSEK, 2009). Esse elemento representa aproximadamente 78% do ar atmosférico (N₂), sendo o gás mais abundante na natureza (HAAG et al., 2012), mas que as plantas não conseguem utilizá-lo diretamente, devido a estabilidade que sua tripla ligação o confere.

Existem alguns fenômenos que promovem a redução do N₂ da atmosfera em uma forma molecular disponível às plantas, como a amônia (NH₃), que são: a) descargas elétricas na forma de raios que liberam uma grande quantidade de energia (DRAPCHO et al., 1983) e, b) industrial (processo Haber-Bosch), que utiliza fontes não renováveis de energia como os combustíveis fósseis e o gás natural para a geração de uma condição de alta temperatura e pressão que permite a redução do N₂ para amônia. Esse processo consome de 1 a 2% do total da energia gerada no mundo e emite mais de 300 milhões de toneladas métricas de dióxido de carbono por ano, tornando-se um processo poluidor (CHERKASOV et al., 2015).

Biologicamente, apenas microrganismos denominados diazotróficos conseguem reduzir o gás N₂ e fixar o N no composto amoníaco (NH₃). Esse processo é denominado como fixação biológica de nitrogênio. O processo de redução do nitrogênio realizado por bactérias diazotróficas é catalisado pelas nitrogenases, uma enzima que integra a família de metaloenzimas complexas e com características mecânicas e estruturais conservadas, entre as quais a molibdênio-nitrogenase (Mo-nitrogenase) é a mais comum (DIXON & KAHN, 2004; HU & RIBBE, 2015). A estrutura da Mo-nitrogenase é formada por proteínas metalossulfúricas: a proteína de ferro, também conhecida como nitrogenase redutase (codificada pelo gene *nifH*) e proteína molibdênio-ferro, também conhecida como subunidades alfa e beta da nitrogenase (codificada pelos genes *nifD* e *nifK*) (DIXON & KAHN, 2004). Além desses genes, que formam o “coração” da nitrogenase, diversos outros são essenciais para sua síntese e funcionamento, e geralmente estão agrupados em sequência no genoma da bactéria, formando o *cluster* de genes *nif* (MASSON-BOIVIN et al., 2009).

O complexo enzimático da nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio e foi observado que os microrganismos diazotróficos têm preferência pela ocupação de sítios onde a concentração de oxigênio (O_2) seja baixa (DÖBEREINER et al., 1995). Devido à capacidade de plantas da família Fabaceae em formarem nódulos radiculares em simbiose com rizóbios, muitas espécies dessa família conseguem adquirir o N suficiente para suprir suas necessidades metabólicas. A principal função do nódulo é produzir um ambiente propício para a fixação de N pela bactéria, impondo restrições ao fluxo livre de O_2 , que inativa a nitrogenase (OLDROYD, 2013). O fato das plantas da família Poaceae não possuírem um órgão especializado com tal capacidade, pode ser um dos motivos pelos quais a associação com bactérias diazotróficas não tenha a mesma eficiência para suprir as demandas de N observada para as Fabaceae.

A FBN para as plantas da família Poaceae pode ser quantificada através de métodos tais como o balanço total de N no sistema solo-planta e técnicas isotópicas com o ^{15}N , sendo esta última feita pela diluição isotópica do ^{15}N ou abundância natural de ^{15}N (BALDANI et al., 2009). O método de N total estima a fixação de N_2 com o aumento líquido no total de N de um sistema planta-solo. Se todas as entradas externas e as saídas de N podem ser contabilizadas e as mudanças incrementais do N do solo quantificadas, um equilíbrio do N líquido positivo no sistema pode ser atribuído à fixação de N_2 (BODDEY & KNOWLES, 1987; UNKOVICH et al., 2008).

A técnica de abundância natural já foi utilizada para a quantificação da FBN em cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2001; SCHULTZ et al., 2014; URQUIAGA et al., 2012). Essa técnica baseia-se no princípio de enriquecimento natural do N do solo com o isótopo ^{15}N em relação ao N atmosférico (SHEARER & KOHL, 1986). A constituição isotópica do N atmosférico é: 99,6337% de ^{14}N e 0,3663% de ^{15}N (UNKOVICH et al., 2008). Isso permite que haja uma diferença na abundância natural de ^{15}N entre plantas que obtêm o nitrogênio por FBN e as plantas que obtêm seu N apenas do solo; essas últimas plantas, na experimentação, são chamadas de plantas referências. Devido às variações serem muito pequenas, convencionou-se a utilização da unidade delta, delta ^{15}N ($\delta^{15}N$), sendo que cada unidade de $\delta^{15}N$ é a abundância natural de ^{15}N dividida por mil (0,0003663), ou seja, cada unidade de $\delta^{15}N$ representa uma diferença de um por mil no enriquecimento de ^{15}N entre o solo e o ar. Portanto, leva a conclusão de que espécies de plantas que podem obter uma parte do seu N da atmosfera apresentarão seus valores de $\delta^{15}N$ próximo a zero, isso porque por convenção adota-se o $\delta^{15}N$ do ar atmosférico igual a zero.

Outra técnica que baseia-se na alteração da proporção natural entre os isótopos ^{15}N e ^{14}N é o enriquecimento com ^{15}N , acrescentando-se ao substrato (solo) das plantas a serem testadas adubos nitrogenados artificialmente enriquecidos em proporções que sejam conhecidas, ou seja, adubos marcados (FRIED & BROESHART, 1975). Plantas que só obtenham nitrogênio do solo marcado possuirão um enriquecimento em ^{15}N semelhante ao deste solo. Por outro lado, plantas que obtenham além do N marcado proveniente do solo, N atmosférico (não marcado), sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N (UNKOVICH et al., 2008). Quanto maior a magnitude da diluição, maior a quantidade de N atmosférico incorporado e, por conseguinte, maior a contribuição da FBN.

Quando o objetivo for determinar a capacidade de bactérias diazotróficas de expressar a enzima nitrogenase em vida livre, um dos métodos mais utilizados é o ensaio de redução de acetileno (*Acetylene Reduction Assay-ARA*) “*in vitro*” (HERRIDGE et al., 2008). Esse método usa um meio de cultivo livre de N que permite que a bactéria crie um gradiente de concentração de oxigênio à medida que vai formando uma película de crescimento na superfície do meio, o que torna possível a construção de um ambiente propício ao funcionamento da FBN em vida livre.

O ARA é baseado na capacidade da nitrogenase de reduzir o gás acetileno (C_2H_2) em etileno (C_2H_4), uma molécula sensível à quantificação por cromatografia gasosa (DILWORTH,

1966; HARDY et al., 1973). O ensaio de redução de acetileno é um método indireto, rápido, simples e sensível para medir a fixação de nitrogênio sendo mais simples que os outros métodos utilizados para esse fim (BODDEY & KNOWLES, 1987). Além disso, a atividade da nitrogenase não se modifica quando o N₂ é substituído pelo C₂H₂, apenas os produtos é que são diferentes (BODDEY et al., 2007). Embora o acetileno seja o mais indicado para esse ensaio, o complexo enzimático da nitrogenase é capaz de catalisar outras reações utilizando outros substratos, como: óxido nitroso, prótons (H⁺), azida, cianeto, ciclopropeno e até atividade hidrolítica do ATP (MOZEN & BURRIS, 1954; DILWORTH, 1966; BURRIS, 1988; SCHÖLLHORN & BURRIS, 1967; TAIZ et al., 2017).

2.6. Associação entre *Bradyrhizobium* e Plantas Não-Leguminosas de Interesse Agrônômico

Embora o gênero *Bradyrhizobium* seja muito conhecido pela sua capacidade de fixar nitrogênio em associação simbiótica com leguminosas, ficou claro que o mesmo ocupa ambientes muito mais diversos que nódulos radiculares de leguminosas e também desempenha funções diversas. Foi observado, por exemplo, que algumas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. não possuem genes responsáveis pela nodulação (genes *nod*), mas são capazes de induzir a formação de nódulos caulinares em algumas espécies de leguminosas aquáticas e realizar a fixação biológica de nitrogênio em simbiose com estas plantas, utilizando outros meios para sua infecção (GIRAUD et al., 2000). A maioria das estirpes de *Bradyrhizobium* capazes de induzir nódulos caulinares apresentam um conjunto completo de genes fotossintéticos (GIRAUD et al., 2007a) e devido a essa característica, passaram a ser conhecidos como *Bradyrhizobium* fotossintéticos. Uma alta população de *Bradyrhizobium* spp. não nodulante e capazes de degradar substâncias aromáticas foi observada em solos de floresta na América do Norte (VANINSBERGHE et al., 2015). Além disso, algumas estirpes de *Bradyrhizobium* que colonizam endofiticamente plantas de arroz são capazes de produzir ácido indolacético (IAA) e 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase) (PIROMYOU et al., 2017).

2.7. Rizóbios e Fixação de Nitrogênio em Vida Livre

Já nos anos 1970, alguns estudos mostram que estirpes de *Bradyrhizobium* têm a capacidade de fixar nitrogênio em condição de vida livre (em inglês, FLNF) (KURZ & LARUE, 1975; PAGAN et al., 1975; KANESHIRO & KURTZMAN, 1982). O que evidencia que *Bradyrhizobium* spp. também podem ter um papel na FBN em associação com plantas não leguminosas. Atividade de nitrogenase foi verificada, por exemplo, em plantas de arroz inoculadas com estirpes endofíticas de *Bradyrhizobium* (CHARENTREUIL et al., 2000). Nesse mesmo estudo, foi verificado acréscimo de 20% na parte aérea e rendimento de grãos nas plantas inoculadas. GREETATORN et al. (2019) sugeriram que a fixação de nitrogênio estimulou o desenvolvimento de plantas de arroz inoculadas com a estirpe SUTN9-2 de *Bradyrhizobium*.

Em estudo com milho, sequências de DNA relacionadas ao gene *nifH* de *Bradyrhizobium* spp. foram abundantemente encontradas em solo rizosférico e raízes por meio do uso de ferramentas moleculares (ROESCH et al., 2008; SOLANKI et al., 2020). Rodrigues Coelho et al. (2008), avaliando a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera de sorgo, por meio da amplificação por PCR direta dos solos da rizosfera e subsequente clonagem e análise de sequência parcial de gene *nifH*, observaram que filotipos de *nifH* relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* eram abundantes também nessa cultura, o que sugere importante participação de *Bradyrhizobium* na FBN nessa cultura. Mais tarde, a fixação de nitrogênio em plantas de sorgo foi observada por ensaio de redução de acetileno, que

juntamente com abordagens de metagenômica, proteômica e isolamento revelaram que as principais bactérias funcionais fixadoras de nitrogênio nas raízes de sorgo estudadas eram do gênero *Bradyrhizobium* (HARA et al., 2019). Em batata-doce, TERAKADO-TONOOKA et al. (2013) isolaram uma estirpe de *Bradyrhizobium* capaz de fixar nitrogênio em vida livre, cuja inoculação em plantas de batata-doce resultou em aumento de peso fresco e atividade de nitrogenase em plantas inoculadas.

Em cana-de-açúcar, a utilização de métodos independentes de cultivo também levou à observação de abundância do filotipo de *nifH* relacionado ao gênero *Bradyrhizobium*, o que sugere atividade de FBN desse gênero em cana-de-açúcar (FISCHER et al., 2012; YONEYAMA et al., 2019). Rouws et al. (2014), posteriormente isolaram uma coleção filogeneticamente diversa de estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* endofíticos de raízes dessa cultura. Nessa coleção foi possível identificar estirpes nodulíferas e não nodulíferas com capacidade de fixar nitrogênio em vida livre por ensaio de redução de acetileno (ROUWS et al., 2014). Além disso, uma nova espécie de *Bradyrhizobium* foi descrita a partir da caracterização de estirpes do grupo geneticamente mais abundante dessa coleção, sendo nomeada de *Bradyrhizobium sacchari* (DE MATOS et al., 2017). Mais tarde outra coleção de *Bradyrhizobium* filogeneticamente diversas também foi isolada a partir de raízes de cana-de-açúcar por Júnior et al. (2019), na qual alguns isolados se mostraram filogeneticamente semelhantes à espécie *Bradyrhizobium sacchari*.

2.8. Rotação de Culturas no Cultivo de Cana-de-Açúcar

A produção de cana-de-açúcar no Brasil é caracterizada por ser um sistema de agricultura intensiva e que apresenta um fluxo de nutriente consideravelmente elevado. Isso pode resultar em problemas fitossanitários e diminuição das reservas nutricionais do solo em virtude da sua remoção por parte da cultura ou de processos de erosão (GOPALASUNDARAM et al., 2012), acarretando um aumento nos gastos com fertilizantes para manutenção do canavial. Portanto, diversas práticas alternativas à aplicação de fertilizantes químicos nos cultivos dessa cultura e de conservação do solo tem sido investigadas. Uma prática que vem dando bons resultados é a rotação de culturas com plantas da família Fabaceae (PARK et al., 2010). Em função de seu potencial de fixação de nitrogênio em associação com rizóbios, as Fabaceae representam uma alternativa ao suprimento, substituição ou complementação da adubação mineral e recomposição da fertilidade do solo (SCIVITTARO et al., 2000). Diversas plantas são usadas em rotação de culturas com a cana-de-açúcar, sendo as mais comuns a crotalária (*Crotalária juncea*), a soja (*Glycine max*), a mucuna (*Mucuna pruriens*) e o amendoim (*Arachis hypogaea*) (AMBROSANO et al., 2011). Além de melhorar a fertilidade do solo, o uso de amendoim e soja em rotação com cana-de-açúcar na renovação do canavial se mostrou benéfico para suprimir espécies de ervas daninhas difíceis de controlar como a *Cyperus rotundus* e *Commelina bengalensis* (SOARES et al., 2017). Ambrosano et al. (2011) notaram um melhor desempenho de cana-de-açúcar após cinco cortes com o cultivo prévio de *Crotalária júncea* IAC 1. O sistema de rotação promoveu incrementos de 30% e 35% na produtividade de colmos e de açúcar, respectivamente.

Embora todos esses trabalhos tenham focado no benefício indireto para a cana-de-açúcar, é possível que parte desses resultados tenha sido oriundo da associação dos rizóbios com a cana-de-açúcar, uma vez que as leguminosas podem aumentar a quantidade dessas bactérias no solo após a senescência dos nódulos. A cultura da soja, por exemplo, pertence a um dos grupos de leguminosas que permitem a desdiferenciação de bacteroides que passam a viver de forma saprofitica no solo (KONDOROSI et al., 2013). Em área de pós colheita de soja, a população de rizóbios foi estimada acima de 10^5 células por grama de solo (ZILLI et al., 2013), em alguns casos torna-se desnecessária a reinoculação no plantio. Em estudo de rotação de cultura entre feijão mungo (*Vigna radiata*) e arroz inoculado com estirpe de *Bradyrhizobium*

capaz de associar simbioticamente com feijão mungo e ocorrer como endófito em arroz, foi possível observar a nodulação do feijão mungo após a decomposição dos talos de arroz (PIROMYOU et al., 2017). Esses resultados sugerem que talos de arroz inoculados possam ser utilizados como fonte de inoculo para o feijão mungo no sistema de rotação de cultura. Esses mesmos autores mostram que algumas estirpes de *Bradyrhizobium* endofíticas de arroz poderiam realizar a produção de IAA e a atividade de ACC deaminase, juntamente com a capacidade de fixação de nitrogênio durante a associação dentro dos tecidos de arroz.

3 CAPITULO I

CORRESPONDÊNCIA MORFOCULTURAL, GENÉTICA E FILOGENÉTICA EM *Bradyrhizobium* spp. ISOLADOS DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR

3.1. RESUMO

A caracterização de coleções de rizóbios geralmente envolve métodos morfoculturais e genéticos. Embora todas as estirpes compartilhem algumas características morfoculturais, o gênero *Bradyrhizobium* é composto por grupos filogenéticos que podem ser diferenciados com base em alguns detalhes morfoculturais. Para a classificação de novas bactérias desse gênero, frequentemente são usados métodos de impressão digital baseados em elementos repetitivos utilizando reação em cadeia da polimerase (rep-PCR). Dois tipos de sequências muito aplicadas são as sequências de consenso intergênico repetitivo enterobacteriano (ERIC-PCR) e elemento BOX (BOX-PCR). O presente trabalho buscou avaliar se esses dois métodos de perfilamento genético possuem resultados consistentes entre si e com a caracterização morfocultural em uma coleção de estirpes de *Bradyrhizobium*. Para isso, foi utilizada uma coleção com 103 bactérias isoladas de raízes de cana-de-açúcar para caracterização fenotípica (produção de muco; tamanho, forma e elevação de colônia), perfilamento genético (perfis de PCR BOX e ERIC) e filogenética (análise de sequência de gene *recA*). As características fenotípicas das estirpes da coleção foram comparadas com estirpes tipo de diferentes espécies dos principais superclados do gênero *Bradyrhizobium*, enquanto a árvore filogenética do gene *recA* foi construída com sequências dos isolados da coleção e estirpes tipo. Foi realizada análise individual e conjunta de BOX e ERIC-PCR. A caracterização fenotípica das estirpes tipo de *Bradyrhizobium* permitiu separar claramente as estirpes do superclado *B. japonicum* das estirpes do superclado *B. elkanii*, enquanto as estirpes dos superclados *B. jicamae* e do superclado fotossintético apresentaram fenótipos semelhantes. A análise conjunta dos perfis gerados pelas técnicas de perfilamento genético revelou 19 grupos a 70% de similaridade. A análise filogenética das sequências do gene *recA* revelou a existência de sete clados dentro da coleção. Os resultados mostraram correspondência entre as características fenotípicas com as análises de impressão digital e de filogenia do gene *recA*. Além disso, a análise individual de ERIC-PCR, considerando 70% de similaridade, mostrou maior correspondência com a filogenia do gene *recA*, enquanto a análise do BOX-PCR a 100% de similaridade, discrimina melhor a microdiversidade. Esses resultados atestam a eficiência de técnicas de impressão digital genético para discriminação de microdiversidade de *Bradyrhizobium* e sua correspondência com características morfoculturais e também que a caracterização morfocultural representa uma forma rápida e simples para permitir uma classificação inicial a nível de superclado do novos isolados do gênero *Bradyrhizobium*.

Palavras-chave: rep-PCR, caracterização de isolados bacterianos, correspondência fenotipo-genótipo.

3.2. ABSTRACT

The characterization of rhizobia collections usually involves morphocultural and genetic methods. Although all strains share some morphocultural characteristics, the genus *Bradyrhizobium* is composed of phylogenetic groups that can be differentiated based on some morphocultural details. For the classification of new bacteria of this genus, genetic profiling methods based on repetitive elements using polymerase chain reaction (rep-PCR) are often used. Two types of sequences widely used are the enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC-PCR) and the BOX element (BOX-PCR). The present work aimed to evaluate whether these two genetic profiling methods have consistent results with each other and with the morphocultural characteristics in a collection of *Bradyrhizobium* strains. For this, a collection of 103 bacteria isolated from sugarcane roots was used for phenotypic characterization (mucus production; size, shape and colony elevation), genetic profiling (PCR BOX and ERIC profiles) and phylogenetic (analysis) of *recA* gene sequence). The phenotypic characteristics of the strains from the collection were compared with type strains of different species from the main superclades of the genus *Bradyrhizobium*, while the phylogenetic tree of the *recA* gene was constructed with sequences from the isolates from the collection and type strains. Joint and individual analysis of BOX and ERIC-PCR was performed. The phenotypic characterization of *Bradyrhizobium* type strains allowed to clearly separate the *B. japonicum* superclade strains from the *B. elkanii* superclade strains, while the *B. jicamae* superclade and photosynthetic superclade strains showed similar phenotypes. The joint analysis of the profiles generated by genetic profiling techniques revealed 19 groups at 70% similarity. Phylogenetic analysis of the *recA* gene sequences revealed the existence of seven clades within the collection. The results showed correspondence between the phenotypic characteristics with the tillering and phylogeny analysis of the *recA* gene. Furthermore, the individual ERIC-PCR analysis, considering 70% similarity, showed greater correspondence with the phylogeny of the *recA* gene, while the BOX-PCR analysis discriminates better the microdiversity at 100% similarity. These results attest the efficiency of genetic profiling techniques to discriminate *Bradyrhizobium* microdiversity and its correspondence with morphocultural characteristics and also that morphocultural characterization represents a quick and simple way to allow an initial classification at the superclade level of new isolates of the genus *Bradyrhizobium*.

Keywords: rep-PCR, characterization of bacterial isolates, phenotype-genotype correspondence.

3.3. INTRODUÇÃO

Bradyrhizobium é um gênero de bactéria muito conhecido pela sua eficiente associação simbiótica com culturas da família Fabaceae (leguminosas) (JORDAN, 1982a). A capacidade de alguns de seus membros fixar nitrogênio do ambiente foi a chave para o sucesso do cultivo da soja no Brasil, por exemplo (ALVES et al., 2003). Devido aos benefícios ambientais e econômico do uso de *Bradyrhizobium* na agricultura, há uma incessante procura por novas estirpes cada vez mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN). Essa procura deixou claro que representantes deste gênero ocupam ambientes muito mais diversos do que os nódulos radiculares de leguminosas e também desempenham funções diversas, inclusive, colonizando a rizosfera e endosfera de gramíneas como cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014; SOLANKI et al., 2019). Entretanto, na busca por novas estirpes microbianas é comum realizar uma caracterização fenotípica e genotípica utilizando métodos padronizados abrangidos pela definição de táxons em espécies específicas (GEVERS et al., 2005; ROSSELLÓ-MÓRA, 2012; TINDALL et al., 2010).

A caracterização fenotípica de isolados, geralmente, é a primeira a ser realizada e também é a metodologia mais antiga para caracterização microbiana ainda em uso. Embora a identificação de diferenças fenotípicas significativas não seja fácil nem objetiva, é necessária que haja consistências dentro da espécie (GEVERS et al., 2005), pois para apoiar a descrição taxonômica de estirpes, é necessário uma descrição que mostre claramente as características fenotípicas quando se está lidando com um novo táxon (TINDALL et al., 2010). As características fenotípicas gerais que são comumente observadas no primeiro momento de isolamento de estirpes de *Bradyrhizobium* são as chamadas características morfoculturais, como por exemplo o tempo de formação, tamanho e forma das colônias, produção de muco e alcalinização do meio de crescimento, quando utilizado indicador de pH, que devem apresentar consistência com a descrição do gênero (JORDAN, 1982; WADOWIAK & MAŁEK, 2000).

Nas últimas décadas o estudo de diversidade microbiana teve grande avanço diante do desenvolvimento de várias técnicas com marcadores moleculares que permitem maior precisão nos ensaios e possibilitam distinguir isolados geneticamente semelhantes (KASCHUK et al., 2006). O uso de genes codificadores de proteínas com funções essenciais, denominados de genes *housekeeping*, mostrou grande eficiência na distinção, inclusive, entre espécies próximas (DELAMUTA et al., 2013). Recentemente, através de análise filogenética robusta aplicando análise de 128 genes *housekeeping* de 200 estirpes de *Bradyrhizobium* spp. com genomas disponíveis, foi sugerida uma nova organização das estirpes desse gênero em sete super clados (*B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. jicamae*, fotossintético, kakadu, solo 1 e solo 2) (AVONTUUR et al., 2019), que por muito tempo foi dividido apenas nos super clados de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (ASERSE et al., 2012).

Entre os diversos métodos aplicados em caracterização genotípica, há os baseados em elementos repetitivos utilizando reação em cadeia da polimerase (rep-PCR), que envolvem o uso de sequências curtas de DNA que servem como *primers* para amplificação de fragmentos distintos diretamente do genoma, criando uma “impressão digital” das estirpes (LUPSKI & WEINSTOCK, 1992). Pode-se destacar três tipos de sequências genômicas muito usadas entre os métodos de rep-PCR: a sequência palindrômica extragênica repetitiva (REP), a sequência de consenso intergênico repetitivo enterobacteriano (ERIC) e o elemento BOX, composto por três subunidades (boxA, boxB e boxZ) (RADEMAKER & BRUIJN, 1997; SCHNEIDER & DE BRUIJN, 1996; VERSALOVIC et al., 1994).

O uso da rep-PCR, em contraste com o uso de genes únicos em análises filogenéticas, gera um perfil que reflete o genoma inteiro, além disso é um método que possui capacidade de diferenciar estirpes estreitamente relacionadas de forma rápida, barata e confiável (LOUWS et al., 1994; RADEMAKER & BRUIJN, 1997; VERSALOVIC et al., 1994). É importante frisar

que técnicas moleculares apresentam diferentes tipos de polimorfismo, sendo dependente da região do genoma que é revelada (LOUWS et al., 1994). Assim, em alguns casos, é comum que mais de uma técnica de rep-PCR sejam aplicadas em análise comparativa de uma mesma coleção de estirpes, as vezes até mesmo em conjunto com a análise de um gene marcador (DE BRUIJN, 1992; ELBOUTAHIRI et al., 2009; MATSUBARA; ZÚÑIGA-DÁVILA, 2015; REZENE et al., 2018). Em rizóbios, costuma-se utilizar as sequências de BOX e ERIC para distinção de estirpes geneticamente semelhantes (DE BRUIJN, 1992; MENNA et al., 2009). Por serem técnicas eficientes na distinção de estirpes de *Bradyrhizobium* e que possuem custos de aplicação equivalentes que permitem análises com múltiplas amostras, muitas vezes é difícil decidir entre qual deve ser utilizada em uma coleção de cultura.

Portanto, o presente estudo buscou avaliar se as análises de perfilamento genético ERIC-PCR e BOX-PCR dão resultados consistentes com a caracterização morfocultural e filogenética em uma coleção de estirpes de *Bradyrhizobium* obtidas do interior de raízes de cana-de-açúcar.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Estirpes e Meio de Cultura

Foi utilizada uma coleção composta por 103 estirpes do gênero *Bradyrhizobium* que foram isoladas utilizando feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) como “planta isca” a partir de raízes de cana-de-açúcar cv. RB867515 cultivada na área experimental da Embrapa Agrobiologia (ROUWS et al., 2014). As estirpes foram cultivadas em meio de cultura YMA e TY líquido (VINCENT, 1970) a 28°C.

3.4.2. Caracterização Morfocultural

Para caracterização morfocultural, as estirpes de *Bradyrhizobium* foram crescidas em meio de cultura YMA a 28 °C por sete dias. Após esse período foram observados tamanho, forma e consistência das colônias e produção de muco, de acordo com Wdowiak & Malek, (2000). Imagens da cultura pura foram capturadas utilizando *Colony Doc-It Imaging Station* (UVP, Upland, CA). Estirpes tipo de espécies representantes dos supergrupos *Bradyrhizobium japonicum* (*B. sacchari* BR 10280, *B. stylosanthis* BR 446, *B. arachidis* CCBAU 051107, *B. ottawaense* OO99, *B. japonicum* USDA 6, *B. yuanmingense* CCBAU 10071, *B. manausense* BR 3351, *B. neotropiale* BR 10247, *B. centrolobii* BR 10247), *Bradyrhizobium elkanii* (*B. topiciagri* SEMIA 6148, *B. pachyrhizi* PAC 48, *B. elkanii* USDA 76, *B. embrapense* SEMIA 6208), *Bradyrhizobium jicamae* (*B. jicamae* PAC 68, *B. valentinum* LmjM3, *B. paxllaeri* LMTR21, *B. icense* LMTR13) e fotossintético (*B. denitrificans* LMG 8443, *B. oligotrophicum* S58), segundo classificação de Avontuur et al. (2019), foram também caracterizadas. Estirpes representantes dos supergrupos kakadu, solo 1 e sole 2 não foram utilizadas no estudo por possuírem poucos representantes identificados e não haver nenhum na coleção de cultura utilizada. As estirpes tipo foram obtidas da coleção do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner, Embrapa Agrobiologia, Brasil.

3.4.3. Caracterização De Fingerprint

ERIC-PCR

Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) usando iniciadores para sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias (ERIC) a fim de identificar redundâncias genotípicas. As reações de ERIC-PCR foram realizadas sem a extração de DNA dos isolados, utilizando uma suspensão de células de cada isolado como fonte do DNA genômico. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, contendo tampão 1 X; dNTP 0,3 mM; iniciadores ERIC 1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') 1 µM e ERIC 2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGCG-3') 1 µM (VERSALOVIC et al., 1991; WOODS et al., 1993); 1 U Taq DNA polimerase (Promega). O volume foi completado com água bidestilada esterilizada. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany), programado com um ciclo de desnaturação inicial a 97 °C por 7 min; 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min); anelamento (52 °C por 1 min) e extensão (65 °C por 8 min); um ciclo de extensão final (68 °C por 16 min); manutenção a 4 °C.

BOX-PCR

Para as reações de BOX-PCR também foram utilizadas suspensões de células como fonte do DNA genômico das estirpes. O volume final de cada reação foi de 20 µL, contendo tampão 1 X; dNTP 0,3 mM; iniciador BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') 1 µM (VERSALOVIC et al., 1994); 1 U Taq DNA polimerase (Promega). O volume foi completado com água bidestilada esterilizada. As reações de amplificação foram conduzidas

em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany), programado com um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min; 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min); anelamento (53 °C por 1 min) e extensão (65 °C por 8 min); um ciclo de extensão final (65 °C por 16 min); manutenção a 4 °C.

Eletroforese

Após o término das reações, 10 µL dos produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% a 80 volts por 4 horas em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e as imagens capturadas sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®). Como referência foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen).

Análise de cluster

As análises de cluster foram realizadas para os produtos de rep-PCR BOX-PCR e ERIC-PCR, com auxílio do programa Bionumerics v7.5 (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) e o coeficiente de correlação Jaccard. Para análise do BOX-PCR os níveis de otimização e tolerâncias foram ajustados para 0,85% e 2%, respectivamente. Para o ERIC-PCR os níveis de otimização e tolerâncias foram ajustados para 0,5% e 1,5%, respectivamente. Para análise conjunta do ERIC/BOX o coeficiente de similaridade foi uma média entre os valores dos dois, resultando em otimização e tolerâncias de 0,675% e 1,75%, respectivamente. Utilizando uma linha de corte em 70% de similaridade, as estirpes representativas foram selecionadas para a identificação de linhagens filogenéticas por meio do sequenciamento do gene *recA*.

3.4.4. Amplificação e Sequenciamento do Gene *recA*

Optou-se a utilização do gene *recA* devido sua alta capacidade de distinção de táxons dentro do gênero *Bradyrhizobium* e por possuir um grande número de estirpes tipo desse gênero com seu gene sequenciado e disponível em banco de dados de livre acesso.

A extração de DNA das estirpes foi realizada a partir de colônias puras, obtidas após crescimento em meio de cultura TY líquido (VINCENT, 1970) durante 3 dias a 28°C, sob agitação de 150 rpm. Para extração do DNA foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% a 90 volts por 1,5 horas em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e as imagens capturadas sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®). As amostras de DNA extraídas foram separadas em alíquotas para evitar descongelamentos sucessivos e provocar degradação. Seu armazenamento foi realizado em freezer a -20 °C.

As estirpes foram submetidas a reação de PCR para o gene *recA* com os primers TSRecAF e TSRecAR (STĘPKOWSKI et al., 2005) utilizando o Kit Gotaq DNA polimerase (Promega), em volume final de 50 µL, com concentração por reação: buffer 1X; dNTP 0,25 mM; primer TSRecAF e TSRecAR 0,25 µM cada; 1,50 U Taq DNA polimerase e 1,0 µL de amostra de DNA. A amplificação do gene foi realizada com termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) programado com os ciclos a seguir: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 29 ciclos de extensão (95 °C por 1 minuto); anelamento (60 °C a 2 minutos) extensão (72 °C por 2 minutos); 1 ciclo de extensão final (72 °C por 5 minutos) e manutenção a 4 °C.

O sucesso da amplificação do gene *recA* foi confirmado após eletroforese em gel de agarose 2% (tampão TAE 1X) a 100 Volts por uma hora, que em seguida foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg ml⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador

Kodak Logic 100 (Kodak®). O produto da PCR foi parcialmente sequenciado utilizando os iniciadores TSRecAf (CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG) e TSRecAr (CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG) para o gene *recA* pelo analisador de DNA ABI 3730x1 (Applied Biosystems).

Alinhamentos das sequências foram conduzidos usando a ferramenta integrada Clustaw do software MEGA7 (KUMAR et al., 2016). Árvores filogenéticas foram calculadas usando o método de construção neighbor joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987). A força da topologia das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando o método de inicialização através da aplicação de 1000 pseudoreplicatas (FELSENSTEIN, 1985). As sequências com mais de 97% de similaridade foram consideradas como do mesmo grupo.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Morfologia de Colônia

As estirpes tipo das espécies dos supergrupos de *B. japonicum* e *B. elkanii* possuem características morfoculturais que facilmente as distinguem entre si e dos supergrupos *B. jicamae* e fotossintético. As estirpes dos supergrupos *B. jicamae* e fotossintético compartilham características morfoculturais semelhantes que dificultam a distinção entre os dois grupos (Figura 1). Diante disso, o supergrupo de *B. japonicum* será referido nesse estudo como apresentando fenótipo Bj, supergrupo *B. elkanii* como fenótipo Be e os supergrupo *B. jicamae* e fotossintético como fenótipo P (Figura 1). As estirpes da coleção de *Bradyrhizobium* isoladas de raízes de cana-de-açúcar apresentaram os fenótipos Bj e Be, de acordo com as características morfoculturais da Figura 1.

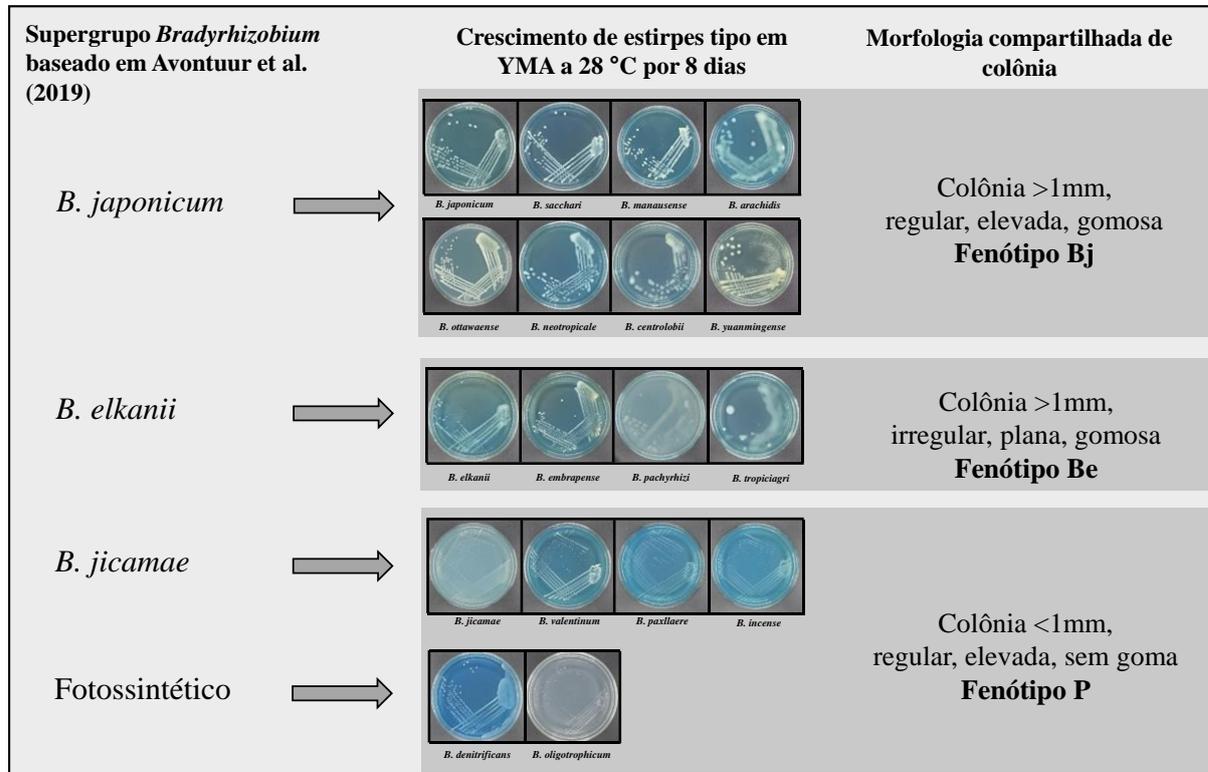


Figura 1. Características morfoculturais de colônias puras de estirpes tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes foram agrupadas de acordo com semelhanças observadas

e divididas em grupos fenotípicos seguindo a nomenclatura do agrupamento feito por Avontuur et al. (2019).

3.5.2 Análise Genômica

A análise conjunta dos perfis polimórficos gerados pelas técnicas de BOX e ERIC PCR revelou 37 perfis (100% de similaridade) (Figura 2). Dos 37 perfis, 14 foram redundantes na coleção, enquanto 23 perfis foram de ocorrência única. Quando considerado o nível de similaridade de 70% entre os perfis, geralmente aplicado nos estudos de diversidade de rizóbios com rep-PCR (ALBERTON et al., 2006; GRANGE & HUNGRIA, 2004; MENNA et al., 2009), foi possível identificar 19 grupos (A-S). Os grupos L (35) e K (17) foram os mais abundantes, ambos congregando as estirpes com fenótipo morfocultural Bj e Be, respectivamente.

Os elementos BOX possuem 154 pb (pares de base) no total, sendo 59, 45 e 50 para as subunidades boxA, boxB e boxC, respectivamente (MARTIN et al., 1992). As sequências do ERIC têm 126 pb de comprimento com uma repetição invertida central altamente conservada, e fica situado em regiões transcritas não codificantes do cromossomo (HULTON et al., 1991; SHARPLES & LLOYD, 1990). Essas duas metodologias possuem diferentes fundamentos evolutivos, embora tenham como alvo a identificação de sequências consensuais que se repetem em número variável de cópias no genoma, e possuem relação com o grupo filogenético estudado. Em resumo, o primer BOX é complementar à subunidade boxA dos elementos BOX, enquanto o primer ERIC identifica sequências palindrômicas intergênicas (HULTON et al., 1991; SHARPLES & LLOYD, 1990; VERSALOVIC et al., 1991, 1994).

Considerando a análise separada dos marcadores de *fingerprint*, pela análise de BOX-PCR foi possível identificar 31 perfis polimórficos (100% de similaridade), dos quais 18 foram redundantes (composto por duas ou mais estirpes) e 13 de ocorrência única (apenas uma estirpe). Quando a análise considerou um agrupamento dos perfis com 70% de similaridade, foi possível identificar 17 grupos (A-P), sendo três compostos por apenas uma estirpe (Anexo 1). Já pela análise de ERIC-PCR, 24 perfis foram identificados, considerando o nível de 100% de similaridade. Dos 24 perfis identificados, 12 foram compostos por duas ou mais estirpes (redundantes) e 12 foram de ocorrência única. Quando os perfis foram agrupados com nível de similaridade de 70%, foram identificados 20 grupos (A-T), dos quais oito grupos tinham apenas uma estirpe (Anexo 2). Portanto, considerando um nível de 100% de similaridade, a análise de BOX-PCR apresentou maior poder de discriminação para estudar a microdiversidade da coleção, sendo capaz de perceber as diferenças entre as estirpes estreitamente relacionadas, gerando um número maior de perfis polimórficos do que a técnica de ERIC-PCR (Anexo 1). Por outro lado, a análise de ERIC-PCR apresentou maior poder discriminatório ao nível de 70% de similaridade (Anexo 2), resultando em maior correspondência com a análise filogenética do gene *recA*. Menna et al. (2009) relacionam a maior capacidade da análise de BOX-PCR discriminar estirpes mais próximas ao maior polimorfismo formado por essa análise, em comparação ao ERIC-PCR. Esses autores afirmam que pela análise de diversidade por BOX-PCR, estirpes pertencentes a gêneros diferentes não se agrupam em um nível de 70% de similaridade, enquanto que algumas estirpes da mesma espécie podem se posicionar em *clusters* diferentes. Em ambas as análises do presente estudo, mesmo considerando 100% de similaridade, não há estirpes de grupos fenotípicos diferentes congregadas no mesmo agrupamento genético, o que mostra capacidade das duas análises em distinguir os grupos fenotípicos Bj e Be e agrupar as estirpes com mesmo fenótipo (Figura 2; Anexo 1; Anexo 2).

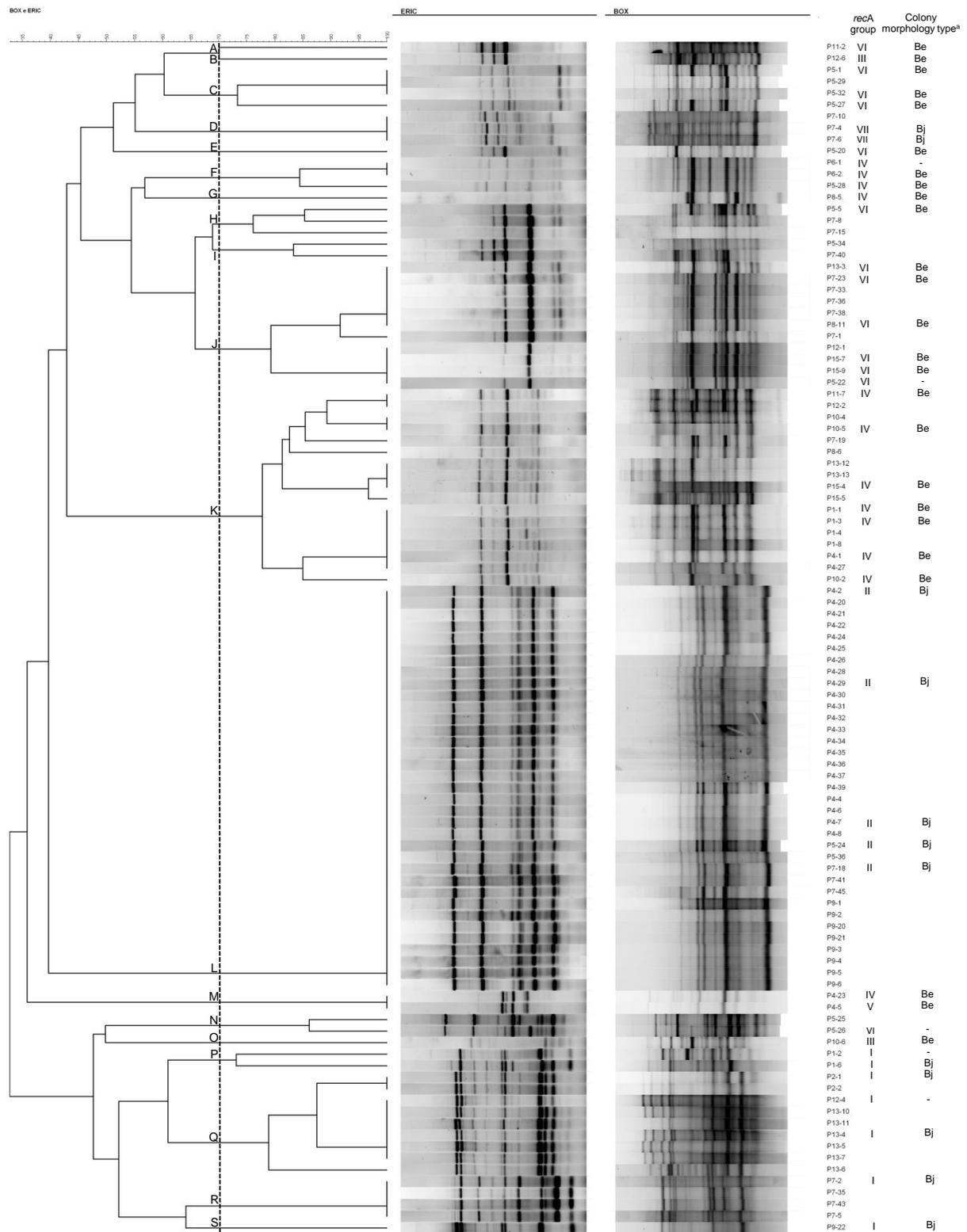
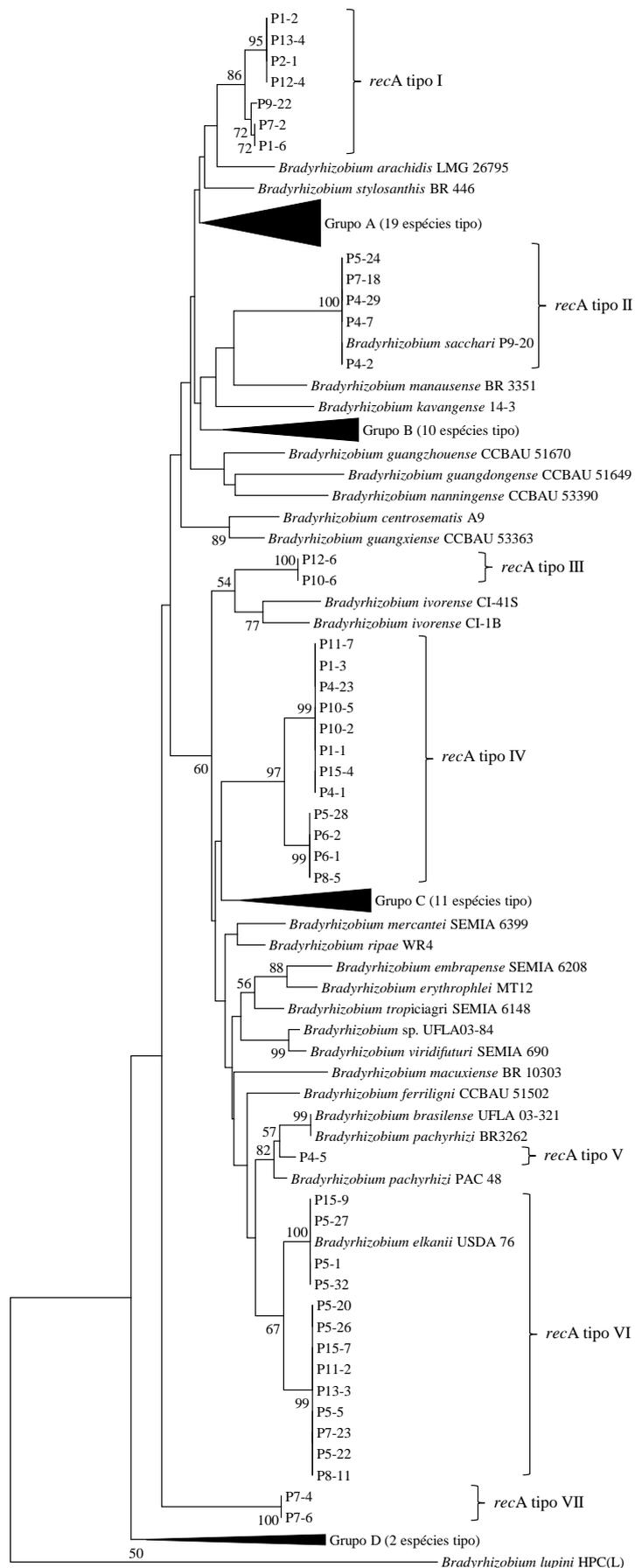


Figura 2. Dendrograma (UPGMA) de similaridade genética construído pela análise conjunta dos perfis polimórficos obtidos por BOX e ERIC-PCR de diferentes isolados de *Bradyrhizobium* spp. obtidos de raízes de cana-de-açúcar. Grupos formados de A-S representam uma linha de corte a 70% de similaridade. Tipos de *recA* de I-VII foram definidos após análise filogenética deste gene nos representantes dos grupos (Figura 3). Tipo de morfologia de colônia foi obtida por caracterização de acordo com a figura 1.

3.5.3 Análise Filogenética do Gene *recA*

A análise filogenética das sequências do gene *recA* revelou a existência de sete tipos (I-VII) filogenéticos, com base no agrupamento das sequências com, pelo menos, 98% de similaridade. O *recA* tipo I ocorreu em sete estirpes que foram separadas em dois clados muito próximos e com variação interna de similaridade entre estirpes de 98,8-100%. As estirpes com *recA* tipo I estão filogeneticamente relacionadas à estirpe *Bradyrhizobium arachidis* LMG 26795^T (97,5-97,7%). O *recA* tipo II ocorreu em seis estirpes com 100% de similaridade entre as sequências, sendo este grupo de estirpes previamente descrito como a nova espécie *Bradyrhizobium sacchari* (DE MATOS et al., 2017). O *recA* tipo III foi identificado nas estirpes P10-6 e P12-6 (100% similaridade) e está associado à espécie de *Bradyrhizobium ivorense* (95,8% de similaridade), porém representando um novo ramo filogenético. O *recA* tipo IV foi representado por 12 estirpes divididas em dois clados muito próximos com 98,5-100% de similaridade entre as sequências. Este grupo representa um novo ramo filogenético ligado a 11 espécies de *Bradyrhizobium*, entre as quais a mais próxima é *B. lablab* com 93,5 a 94,4% de similaridade. A estirpe P4-5 mostrou sequência única de *recA* (tipo V) e está filogeneticamente associada as espécies *B. pachyrhizi* e *B. brasilense* com 96,4% de similaridade. Treze estirpes (*recA* tipo VI) apresentaram sequências com 98,5-100% de similaridade dentro do grupo e estão estreitamente relacionadas com a estirpe tipo de *B. elkanii*. Por fim, as estirpes P7-4 e P7-6, isoladas de nódulos diferentes da mesma planta, possuem sequências de *recA* idênticas (*recA* tipo VII) e com 95% de similaridade com a estirpe tipo da espécie *B. stylosanthis* (Figura 3).

A grande maioria das espécies de *Bradyrhizobium* descritas teve isolamento a partir de nódulos radiculares de leguminosas o que resultou em sua diversidade real sendo subestimada. A figura 3 reflete bem essa realidade, onde a filogenia do gene *recA* das estirpes tipo desse gênero e de estirpes da coleção obtida a partir de tecidos de cana-de-açúcar, uma cultura pouco explorada quanto a colonização por *Bradyrhizobium*, resultou na formação de seis grupos com similaridade inferior a 98%. Ainda assim, é necessária a utilização de análise polifásica para suportar a classificação de novas espécies (DELAMUTA et al., 2013).



0.02

Figura 3. Análise filogenética do gene *recA* de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. obtidas de raízes de cana-de-açúcar e espécies tipo desse gênero. Filograma Neighbor-Joining (NJ) estimado a partir de 410 posições de pares de bases. Valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore NJ foi obtida utilizando o modelo de Kimura 2-parameter, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA 7. A análise envolveu 110 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminadas previamente à análise. *Bradyrhizobium lupini* HPC(L) (AMQQ00000000) foi utilizada como grupo externo. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. Alguns clados colapsados são representados com as letras A a D e as respectivas estirpes podem ser encontradas no Anexo 3. Número de acesso das espécies tipo estão no Anexo 3.

Sequências *recA* com rep-PCR

Embora tenha sido observado alta correspondência dos perfis polimórficos (100% de similaridade) e grupos (70% de similaridade) nas análises de BOX e ERIC-PCR com a análise filogenética para o gene *recA*, principalmente quando os perfis polimórficos foram analisados em conjunto, alguns casos particulares merecem comentários adicionais.

Na análise BOX-PCR as estirpes P10-6 e P12-6, que possuem o tipo III do gene *recA*, ficaram em grupos diferentes. A estirpe P10-6 ficou no grupo F, junto com estirpes com tipo IV do gene *recA*, enquanto que a estirpe P12-6 ficou no grupo H, junto com estirpes do grupo VI do gene *recA* (Anexo 1). Em relação a análise com ERIC-PCR, a estirpe P8-5 que é do tipo IV de *recA*, se agrupou com outras estirpes com o tipo VI, no grupo G (Anexo 2). Embora na análise conjunta de BOX e ERIC-PCR essas estirpes também não tenham se agrupado com seus respectivos tipos de *recA*, não houve agrupamento com estirpes com tipos diferentes (Figura 2). Um caso curioso é o das estirpes P4-23 (*recA* tipo IV) e P4-5 (*recA* tipo V), que independente da análise, conjunta ou individual do BOX e ERIC-PCR, apresentaram o mesmo perfil a nível de 100% de similaridade, mesmo possuindo tipos diferentes de *recA* (Figura 2; Anexo 1; Anexo 2).

Há relatos que filogenias incongruentes do 16S rRNA em grupos de rizóbios podem ocorrer devido a recombinação genética e a transferência horizontal (COENYE et al., 2005; VAN BERKUM et al., 2003). Embora não se tenha relatos de transferência horizontal ou recombinação genica do gene *recA* em *Bradyrhizobium*, essa possibilidade não pode ser descartada para explicar essa similaridade de 100% nas análises de BOX + ERIC-PCR e a divergência no *recA* observada entre as estirpes P4-23 e P4-5. Mesmo com essa possibilidade, ainda ficou clara a correspondência entre as características fenotípicas e análise BOX + ERIC-PCR com a filogenia do gene *recA* dentro dessa coleção de estirpes do gênero *Bradyrhizobium*. Isso pode facilitar o processo de identificação de estirpes representantes de grupos dentro desse gênero.

3.6 CONCLUSÃO

As características morfoculturais de *Bradyrhizobium* podem ser utilizadas para uma classificação preliminar de supergrupo das estirpes;

As análises de BOX-PCR e ERIC-PCR são eficientes para distinguir os grupos fenotípicos dentro dessa coleção;

A análise de BOX-PCR apresenta maior poder discriminatório para estudar a microdiversidade dessa coleção considerando um nível de 100% de similaridade;

Há relação entre a filogenia do gene *recA* e os perfis de BOX-PCR + ERIC-PCR dentro dessa coleção de *Bradyrhizobium*.

4 CAPÍTULO II

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO POR *Bradyrhizobium* spp. DE CANA-DE-AÇÚCAR EM VIDA LIVRE E SIMBIOSE: ASPECTOS GENÉTICOS E EVOLUTIVOS

Trechos do texto desse capítulo foram adaptados do artigo “**Evolution and function of nitrogen fixation gene clusters in sugarcane associated *Bradyrhizobium* strains**”.
Autoria de: Matos G.F., Rouws L.F.M., Simões-Araújo J.L. e Baldani J.I.. Aceito com
menores revisões na revista '**Environmental Microbiology**'.

4.1 RESUMO

O uso de métodos independentes de cultivo evidenciou a participação de representantes do gênero *Bradyrhizobium* na contribuição da FBN para a cana-de-açúcar. Esse evento levou à procura e ao isolamento de várias estirpes filogeneticamente diversas desse gênero a partir das raízes dessa cultura, algumas das quais são capazes de nodular leguminosas (como *Bradyrhizobium sacchari* BR 10280^T), enquanto que outras não (AG48 e M12). Curiosamente, essas três estirpes compartilham a capacidade de fixar nitrogênio em vida livre (FNVL), fato esse observado apenas em algumas estirpes desse gênero e que pode ser uma característica importante para a FBN em plantas não leguminosas. A análise do rascunho genômico de BR 10280^T revelou que essa estirpe pertence ao supergrupo de *B. japonicum* e que carrega dois *clusters* dos principais genes de fixação de nitrogênio (*nif*), incluindo os genes *nifHDK*, sendo um simbiótico (SC) e outro não simbiótico (NSC). Uma abordagem de análise genômica e funcional foi aplicada para entender o papel dessas duplicações genéticas do ponto de vista de uma perspectiva evolutiva. A análise de todas as sequências de genomas de *Bradyrhizobium* disponíveis nos bancos de dados do “National Center for Biotechnology Information e DNA Data Bank of Japan” mostrou que apenas três estirpes (*B. sacchari* BR 10280^T, *B. Guangxiense* CCBAU 53363^T e *Bradyrhizobium* sp. DOA9) possuem os dois tipos de cluster de genes *nif*. Entretanto, a estirpe BR 10280^T apresentou um alto nível de divergência de sequência entre homólogos de genes *nif* individuais, com um deles agrupando-se com o filotipo de genes *nif* presente em supergrupo de *Bradyrhizobium* fotossintéticos (NSC). Ensaio de redução de acetileno (ARA), realizado com estirpes representativas de diferentes cladogramas filogenéticos de *Bradyrhizobium*, mostrou que apenas aqueles portando os genes do tipo NSC apresentaram capacidade de FNVL. Em adição, a análise de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) mostrou que na estirpe BR 10280^T a expressão de *nifH* do *cluster* NSC foi mais fortemente induzida durante a atividade de nitrogenase em vida livre do que no *nifH* do *cluster* SC. Durante a simbiose dentro dos nódulos de *Vigna unguiculata*, ambos os filotipos foram altamente transcritos. Juntos, esses resultados mostram que *Bradyrhizobium* possuem dois tipos de *clusters* de genes *nif*, um simbiótico (SC) e outro não simbiótico (NSC), que podem ser separados nos supergrupos filogenéticos de *Bradyrhizobium japonicum* e fotossintético através de seus conteúdos GC% e organização dos genes, e que o *cluster* de genes *nif* não simbiótico pode estar mais envolvido na FBN em condição de vida livre.

Palavras-chave: fixação associativa de nitrogênio, rizóbio, nodulação, expressão gênica.

4.2 ABSTRACT

The use of independent cultivation methods evidenced the participation of representatives of the genus *Bradyrhizobium* in the BNF contribution to sugarcane. This event led to the search and isolation of several phylogenetically diverse strains of this genus from the roots of this crop, some of which are able to nodulate legumes (such as *Bradyrhizobium sacchari* BR 10280^T), while others do not (AG48 and M12). Interestingly, these three strains share the ability to fix nitrogen under free-living conditions (FNVL), which was observed only in a few strains of this genus and which may be an important characteristic for BNF in non-legume plants. Analysis of the genomic draft of BR 10280^T revealed that this strain belongs to the supergroup of *B. japonicum* and that it carries two clusters of the main nitrogen fixation (*nif*) genes, including the *nifHDK* genes, one symbiotic (SC) and one non-symbiotic (NSC). A genomic and functional analysis approach was applied to understand the role of these genetic duplications from an evolutionary perspective. Analysis of all *Bradyrhizobium* genome sequences available in the National Center for Biotechnology Information and DNA Data Bank of Japan databases showed that only three strains (*B. sacchari* BR 10280^T, *B. guangxiense* CCBAU 53363^T and *Bradyrhizobium* sp. DOA9) have the two types of *nif* gene cluster. However, BR 10280^T showed a high level of sequence divergence between homologues of individual *nif* genes, with one of them clustering with the phylotype of *nif* genes present in photosynthetic *Bradyrhizobium* supergroup (NSC). Acetylene reduction assay (ARA), performed with representative strains of different *Bradyrhizobium* phylogenetic clades, showed that only those carrying NSC-type genes showed FNVL capacity. In addition, quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis showed that, in BR 10280^T, the expression of *nifH* from the NSC cluster was more strongly induced during free-living nitrogenase activity than in the *nifH* from the SC cluster. During symbiosis within *Vigna unguiculata* nodules, both phylotypes were highly transcribed. Together, these results show that *Bradyrhizobium* has two types of *nif* gene clusters, one symbiotic (SC) and one non-symbiotic (NSC), which can be separated into the phylogenetic supergroups of *Bradyrhizobium japonicum* and photosynthetic through their% GC contents and organization of the genes, and that the non-symbiotic *nif* gene cluster may be more involved in free-living BNF conditions.

Keywords: associative nitrogen fixation, rhizobia, nodulation, gene expression.

4.3 INTRODUÇÃO

Bradyrhizobium (JORDAN, 1982) é um dos principais gêneros de bactérias que induzem a formação e habitam nódulos radiculares em plantas leguminosas. Estirpes com essa capacidade são comumente conhecidas como ‘rizóbios’. Nessa interação mutualística entre leguminosas e rizóbios, a planta fornece às bactérias seus fotossintatos enquanto os rizóbios fornecem formas assimiláveis de nitrogênio obtido pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (OLDROYD, 2013), um processo que depende da presença da enzima nitrogenase, codificada pelos genes *nif* (DIXON & KAHN, 2004). Em algumas espécies de *Aeschynomene*, um gênero de leguminosas que crescem em áreas alagadas, espécies de *Bradyrhizobium* induzem a formação de nódulos no caule (GIRAUD et al., 2000, 2007b). No entanto, ficou claro que *Bradyrhizobium* spp. ocupam ambientes muito mais diversos que os nódulos de leguminosas e também desempenham funções diversas.

Embora ainda haja pouco conhecimento sobre os mecanismos abióticos capazes de potencializar a FBN em vida livre (FNVL), o que necessita de mais pesquisas nessa linha (SMERCINA et al., 2019), existem evidências que *Bradyrhizobium* spp. podem ter também um papel na FBN em associação com plantas não leguminosas, por exemplo em arroz (CHAINTREUIL et al., 2000; PIROMYOU et al., 2017; GREETATORN et al., 2019), milho (ROESCH et al., 2008), batata doce (TERAKADO-TONOOKA et al., 2013), sorgo (RODRIGUES COELHO et al., 2008; HARA et al., 2019) e cana-de-açúcar (THAWEENUT et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Estirpes filogenética e funcionalmente diversas de *Bradyrhizobium* spp., inclusive, têm sido isoladas de várias dessas culturas e frequentemente essas bactérias são capazes de apresentar FNVL, o que é uma observação relevante para FBN em associação com plantas que não formam nódulos simbióticos. Entre *Bradyrhizobium* spp. obtidos de raízes de cana-de-açúcar, Rouws et al. (2014), por exemplo, descreveram que algumas destas estirpes são capazes de associação simbiótica com leguminosas e também realizar a FNVL (como *Bradyrhizobium sacchari* BR 10280^T), enquanto outras não são capazes de tal associação mas apresentaram capacidade de FNVL (como M12 e AG48). A capacidade de FBN em simbiose e em vida livre observada para *B. sacchari* pode representar uma adaptação às mudanças nas circunstâncias ambientais onde leguminosas e plantas não leguminosas estão disponíveis alternadamente como hospedeiras.

Embora não sejam capazes de se desenvolver usando N₂ atmosférico como fonte única de N, a capacidade de algumas estirpes de *Bradyrhizobium* expressar a atividade de nitrogenase em vida livre vem sendo relatada desde a década de 1970 (KURZ & LARUE, 1975; PAGAN et al., 1975; KANESHIRO & KURTZMAN, 1982). Posteriormente, observou-se que a atividade de nitrogenase em vida livre é comum em um grupo de *Bradyrhizobium* fotossintéticos provenientes de nódulos caulinares de espécies da leguminosa aquática *Aeschynomene* (Alazard 1990 e 1991). As estirpes BTai1 (EAGLESHAM & SZALAY, 1983) e ORS278 (MOLOUBA et al., 1999) são exemplos bastante estudados desse grupo atípico que, além de sua capacidade de fixar nitrogênio em vida livre, possuem a capacidade de nodular algumas espécies de *Aeschynomene*, mesmo não possuindo os genes *nodABC*, que têm papel fundamental na maioria das relações simbióticas de *Bradyrhizobium* com leguminosas (GIRAUD et al., 2007b). Os *Bradyrhizobium* fotossintéticos formam um grupo filogenético distinto (superclado) de dois outros principais superclados representados pelas espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (MOLOUBA et al., 1999; OKUBO et al., 2012). Dois estudos recentes usaram dados de sequências genômicas disponíveis de cerca de 200 estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, confirmando a existência dos superclados de *B. japonicum*, *B. elkanii* e fotossintético, além de alguns clados adicionais que variaram entre os estudos (AVONTUUR et al., 2019; ORMEÑO-ORRILLO & MARTÍNEZ-ROMERO, 2019).

Estudos usando métodos genômicos e moleculares modernos permitiram avanços no conhecimento dos aspectos genéticos e bioquímicos responsáveis pela atividade da nitrogenase em vida livre também em estirpes de *Bradyrhizobium* não fotossintéticos. No coração do processo de FBN, está o complexo enzimático nitrogenase, codificado pelos genes estruturais *nifH* (codificando o homodímero nitrogenase redutase ou proteína Fe) e *nifDK* (codificando as subunidades alfa e beta da nitrogenase ou proteína Fe-Mo) (DIXON & KAHN, 2004). Além desses genes, o gene *nifA* tem um papel regulatório fundamental e os genes *nifBENXQS*, com papéis na biossíntese do cofator Fe-Mo, também costumam estar presentes nos genomas de diversas estirpes de *Bradyrhizobium* (MASSON-BOIVIN et al., 2009). O gene *nifV* é responsável pela síntese de homocitrato, que é um componente essencial do cofator Fe-Mo. Durante as interações simbióticas, a planta pode fornecer o homocitrato ao bacteróide, o que explica porque muitas espécies e estirpes simbióticas não possuem esse gene. Pelo outro lado, o gene *nifV* parece ser fundamental para a capacidade de fixar N em vida livre, quando a planta não pode fornecer o homocitrato (NOUWEN et al., 2017).

No gênero *Bradyrhizobium*, a estirpe não fotossintética DOA9, isolada de nódulos de *Aeschynomene americana* e membro do supergrupo de *B. japonicum*, apresenta uma faixa ampla de hospedeiras, além de apresentar atividade da nitrogenase em vida livre (NOISANGIAM et al., 2012; WONGDEE et al., 2016). Essa estirpe possui todos os genes necessários para FBN, inclusive o gene *nifV*, em seu cromossomo. Além disso, possui um megaplasmídeo carregando cópias dos genes *nifHDK* e alguns outros genes relacionados à FBN (OKAZAKI et al., 2015). Existem evidências sugerindo que as cópias dos genes *nifDK* do cromossomo e do megaplasmídeo contribuem de forma diferenciada para a FBN em situação simbiótica e de vida livre (WONGDEE et al., 2016).

A estirpe BR 10280^T de *Bradyrhizobium sacchari*, endofítica de cana-de-açúcar, também é não fotossintética e pertencente ao supergrupo de *B. japonicum* e, assim como DOA9, apresentou atividade de nitrogenase em vida livre, além da capacidade de formar nódulos ativos em várias espécies de leguminosas (ROUWS et al., 2014; DE MATOS et al., 2017). Acredita-se que a capacidade de FNVL pode ser uma característica importante na sua interação com a planta hospedeira cana-de-açúcar. Neste trabalho, procurou-se compreender melhor a relação entre o conteúdo de genes *nif* e a capacidade de FBN em vida livre no gênero *Bradyrhizobium*, usando a estirpe BR 10280^T em comparação com outras estirpes do gênero. Aplicou-se, para, isso uma abordagem filogenômica com as sequências genômicas de 206 estirpes de *Bradyrhizobium* disponíveis, com base na filogenia recentemente publicado por Avontuur et al. (2019).

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Estirpes de Bactérias e Meios de Cultura

As estirpes *Bradyrhizobium sacchari* BR 10280^T (=P9-20), *Bradyrhizobium* sp. AG48 (= BR 10261), *Bradyrhizobium* sp. M12 (= BR 10289), *B. stylosanthis* (BR 446^T), *B. yuanmingense* (BR 3267), *B. centrolobii* HAMBI 3597^T (= BR 10245^T), *B. neotropica* HAMBI 3599^T (= BR 10247^T), *B. huanghauaihaiense* CGMCC 1.10948^T (= BR 10336^T), *B. oligotrophicum* S58^T (= BR 10343^T) e *Bradyrhizobium* sp. Btai1 (= BR 5350), utilizadas neste estudo, foram obtidas do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner, Embrapa Agrobiologia, Brasil e cultivados a 28°C em meio de cultura de manitol e levedura (YM) ou extrato de levedura e triptona (TY) (VINCENT, 1970). Para obter meio sólido, 1,5% de ágar foi adicionado. O meio semissólido usado para ensaios de redução de acetileno (ARA) foi preparado conforme descrito anteriormente (ROUWS et al., 2014), utilizando 0,4 g L⁻¹ de extrato de levedura (YE) e pH 6,5.

4.4.2 Extração e Sequenciamento de DNA das Estirpes AG48 e M12

Amostras de 2 mL das estirpes AG48 e M12 crescidas em meio TY foram centrifugadas a 10000 rpm por 2 minutos para obtenção da biomassa de células. Para extração do DNA foi utilizado o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega, EUA) de acordo com a recomendação do fabricante.

As sequências foram geradas usando a tecnologia Illumina MiSeq e bibliotecas de amplicons de 300-350 pares de base (bp) na NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, Brasil). Para AG48 e M12, foram obtidas 21.898.828 e 22.386.998 leituras de 101 pares de bases nas extremidades emparelhadas, respectivamente. As leituras da sequência Shotgun foram submetidas ao controle de qualidade usando FastQC 0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e montadas usando SPAdes 3.14.0 (BANKEVICH et al., 2012). A qualidade da montagem foi avaliada usando QUAST (GUREVICH et al., 2013). A montagem do genoma de AG48 tem um comprimento total de 7.561.022 bp, cobertura 292 vezes, 71 contigs (> 1000 bp) e um valor N50 de 190.968. A montagem de M12 tem um comprimento total de 7.755.363 bp, cobertura 291 vezes, 53 contigs (> 1000 bp) e um valor N50 de 244761. As sequências AG48 e M12 foram depositadas em DDBJ/ENA/GenBank sob acessos JACOFQ000000000 e JACOFR000000000, respectivamente. Apenas sequências de genoma não montadas para as estirpes TM122 (DRA006492) e TM124 (DRA006493) estavam disponíveis no DDBJ Sequence Read Archive, portanto, também foram montadas. O conjunto TM122 tinha um comprimento total de 7.937.094 bp, 29 contigs (> 1000 bp) e um valor N50 de 763.987; o conjunto TM124 tinha um comprimento total de 7.114.129 bp, 31 contigs (> 1000 bp) e um valor N50 de 72.7023.

4.4.3 Anotação de Genoma e Organização de Cluster de Genes *nif*

Sequências de genoma (Draft) de 219 estirpes de *Bradyrhizobium* disponíveis publicamente (224 replicons no total, incluindo plasmídeos) foram recuperadas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e do DDBJ Sequence Read Archive em junho de 2019. Juntamente com genomas sequenciados das estirpes AG48 e M12, um total de 221 genomas foram avaliados. Todas as sequências tiveram seus genes anotados usando o servidor RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology) (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014). Para *B. sacchari*, além da estirpe BR 10280^T, a estirpe BR 10556, que tem uma sequência de genoma mais próxima da completa e que possui clusters de genes *nif* idênticos aos de BR 10280^T, também foi usada nas análises. Análises detalhadas, incluindo anotação manual,

determinações de conteúdo de GC% e análises de sintenia foram realizadas com a ajuda do software Artemis (CARVER et al., 2012).

4.4.4 Análise Filogenética

Para melhor compreensão da dissimilaridade entre as duplicatas das sequências dos genes *nifH*, *nifD* e *nifK* da estirpe BR 10280^T e também das demais espécies do gênero *Bradyrhizobium*, foi feita uma busca das sequências gênicas de interesse no software online The RAST (AZIZ et al., 2008). O alinhamento e a análise filogenética foram conduzidos usando o software MEGA 7 (KUMAR et al., 2016). Para a concatenação de genes, as sequências de diferentes estirpes foram alinhadas, cortadas no mesmo comprimento e concatenadas usando o software Seaview (GALTIER et al., 1996). Árvores filogenéticas foram construídas usando o método de neighbor joining (NJ) (SAITOU & NEI, 1987) e Maximum Likelihood (ML) (NEI & KUMAR, 2000). A força da topologia das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando o método de inicialização através da aplicação de 1000 ou 500 pseudoreplicatas (FELSENSTEIN, 1985b).

4.4.5 Ensaios de Redução de Acetileno (ARA)

Para realização do ensaio de redução de acetileno (ARA) as estirpes *B. sacchari* BR 10280^T, *Bradyrhizobium* sp. AG48, *B. stylosanthis* BR 446^T, *B. yuanmingense* BR 3267, *B. centrolobii* BR 10245^T, *B. neotropicale* BR 10247^T, *B. huanghauaihaiense* CGMCC.1.109448^T, *B. oligotrophicum* S58^T e *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 foram cultivadas em meio de cultivo TY. Vinte microlitros da cultura crescida foram inoculados em frascos de penicilina com capacidade de 18 mL contendo 8 mL de meio JMV semissólido modificado e incubados por 7 dias a 28°C no escuro (ROUWS et al., 2014). Após a incubação, os tampões de algodão foram removidos e substituídos por rolhas de borracha, e 10% do volume de ar do espaço superior foi substituído por gás acetileno com auxílio de uma seringa e os frascos foram incubados por mais uma hora a 28 °C. Após este período, alíquotas de 1 mL foram removidas e injetadas em um cromatógrafo de gás equipado com um detector de descarga de ionização de barreira (DIB) (GC BID-2010 Plus, Shimadzu Corporation, Japão). Para o controle negativo, os frascos foram inoculados com meio TY líquido sem bactérias e verificada a ausência de etileno nas culturas que não receberam acetileno. A atividade da nitrogenase foi expressa em nmoles de etileno em frasco⁻¹ hora⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4.6 Expressão de Genes *nifH* e *nifD* em *Bradyrhizobium sacchari* BR 10280^T

4.4.6.1 Montagem experimento

Para o estudo de expressão dos genes *nifH* da estirpe *Bradyrhizobium sacchari* BR 10280^T em condições simbióticas, o RNA total foi extraído de nódulos de *Vigna unguiculata* inoculadas. Para isso, sementes de *Vigna unguiculata* foram pré-germinadas após desinfestação superficial em placas com ágar-água (1%) por três dias e, a seguir, transferidas para garrafas contendo 250 mL de solução Norris livre de N (NORRIS & DATE, 1976), conforme descrito anteriormente por Matos et al. (2017). As mudas foram inoculadas com 1 mL de meio TY líquido contendo aproximadamente 1×10^8 células da estirpe BR 10280^T. O experimento teve seis repetições. Como controle negativo, as plantas receberam meio líquido TY. As plantas foram incubadas sob luz artificial (fotoperíodo de 12 h) a aproximadamente 28 °C. Vinte e cinco dias após a inoculação, os nódulos ativos foram coletados e armazenados a -80 °C. Para o mRNA que representa FNVL, a estirpe BR 10280^T foi cultivada em meio semissólido por sete dias, conforme descrito anteriormente. Após esse período, três frascos foram testados e considerados positivos para a atividade da nitrogenase pela ARA. De três frascos adicionais,

1,5 mL do meio de cultura semissólido, próximo à superfície do meio e densamente povoado por células bacterianas, foi coletado e centrifugado a 10000 rpm por 2 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células armazenadas a -80 °C.

4.4.6.2 Extração de RNA

Para extração do RNA de nódulos foi utilizado um protocolo com TriZol® (RIO et al., 2010). O protocolo consistiu em etapa inicial de maceração dos nódulos com auxílio de nitrogênio líquido, pistilo e gral até a obtenção de um extrato bem fino. Após esse passo, 1 mL do reagente TRIzol foi adicionado e a mistura foi homogeneizada em aparelho tipo votex por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 25 °C por 5 minutos. Posteriormente, 0,2 mL de clorofórmio foi adicionado as amostras, que foram agitadas vigorosamente à mão por 15 segundos, seguido de incubação a 25 °C por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g sob refrigeração (4 °C) por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e deixado a 25 °C por 10 minutos. Foi realizada uma nova centrifugação sob as mesmas condições anteriores, mas por apenas 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. Para retirar o etanol foi realizada centrifugação por 5 minutos. Depois da retirada do excesso de etanol o RNA ficou na bancada por 10 minutos para secar. O RNA foi dissolvido em água tratada com DEPC.

A extração de RNA total das amostras oriundas do crescimento de BR 10280^T em meio de cultivo semissólido foi realizada de acordo com Jahn et al. (2008). O protocolo consistiu em lise inicial das amostras utilizando 800 µL de tampão de lise (TE -10 mM Tris, ajustado para pH 8,0 com HCl, 1 mM de EDTA; e 185 U/mL de solução de lisozima de Ready-Lyse (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). Após a ressuspensão das células, foi adicionado 80 µL de uma solução a 10% de SDS ao lisado, misturado e incubado a 64 °C por 2 min. Após a incubação, 88 µL de NaOAc 1M (pH 5,2) foi misturado com o lisado. A esta solução, foi adicionado um volume igual de fenol ácido, misturado e incubado a 64 °C durante 6 min, invertendo os tubos seis vezes a cada 40s. As amostras foram resfriadas em gelo e centrifugadas a 21000 g por 10 min a 4 °C. A camada aquosa foi transferida para um novo tubo com igual volume de clorofórmio e centrifugada a 21000 g durante 5 min a 4 °C. A camada aquosa foi dividida entre dois microtubos de 1,5 mL e precipitada com etanol pela adição de 1/10 do volume de NaOAc 3M (pH 5,2), 1/10 do volume de EDTA 1 mM e 2 volumes de etanol gelado a cada amostra. As amostras foram misturadas e incubadas a -80 °C por 12 horas. O RNA foi sedimentado por centrifugação a 21000 g durante 25 min a 4 °C. O pelete foi lavado com etanol gelado a 80% e centrifugados a 21000 g durante 5 min a 4 °C. O etanol foi cuidadosamente removido e o precipitado foi seco ao ar por 20 min. O pelete de cada amostra dividida foi dissolvido em um total de 30 µL de água livre de RNase.

4.4.6.3 Tratamento do RNA com DNase, verificação da qualidade e quantificação

Para remover o DNA residual dos extratos de RNA, foi utilizado o kit RNase-Free DNase I (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) seguindo as indicações do fabricante. Foi realizado a adição do tampão e da DNase I na amostra no volume correspondente a 10% do volume final da reação que foi completado com água tratada com DEPC. As amostras foram incubadas a 37 °C por 10 minutos.

A qualidade do RNA após tratamento com DNase foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 2,0% com brometo de etídio (0,02 µL.mL⁻¹) durante 30 minutos a 100 V em tampão TAE 1X preparado com água tratada com DEPC. Em seguida, os géis foram fotografados com fotodocumentador Kodak® Logic 100. A quantificação do RNA foi realizada por leitura por um Qubit® fluorímetro (Invitrogen) usando o Kit Qubit® RNA BR Assay (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.7 Transcrição Reversa e PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

4.4.7.1 Transcrição reversa

Após a purificação, verificação da qualidade e quantificação do RNA, a síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada com 1,3 µg de RNA ou 350 ng de RNA total, respectivamente para os extratos obtidos do nódulo e os extratos obtidos de células em meio semissólido; a quantidade de RNA foi maior para os extratos obtidos do nódulo por considerar a presença de RNA da planta. A reação de transcrição reversa foi realizada com auxílio do kit SuperScript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O primeiro passo foi o preparo de uma reação de 13 µL: 1 µL de mistura de primers hexâmeros randômicos (150 ng), 1 µL de dNTP (10 mM) e 11 µL de RNA. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriadas no gelo por 1 min. O segundo passo foi adicionar para cada amostra 4µL de First Strand buffer 5x, 1µL de DTT 0,1M, 1µL de RNase out, 1µL SuperScript III transcriptase reversa, totalizando 20µL de volume total. As amostras foram então incubadas em sequência a 25 °C por 5 min, 50 °C por 45 min e 70 °C por 15 min.

4.4.7.2 Primers específicos para BR 10280^T

Primers específicos foram desenhados para as duas cópias dos genes *nifH* e *nifD* e genes de referência (*housekeeping*) *rpoB*, *rpoD* e *gyrD* da estirpe BR 10280^T (Tabela 1). Os genes *housekeeping* são utilizados como genes normalizadores em experimento de expressão gênica por apresentarem níveis de expressão estável em diferentes situações testadas (REBOUÇAS et al., 2013). Os *primers* foram desenhados usando o software Primer3 (UNTERGASSER et al., 2012), com comprimentos entre 20 e 22 nucleotídeos, T_m entre 62 e 72 °C e conteúdo de G/C entre 54 e 70%. Os produtos de PCR variaram de 117 a 212 bp e tiveram um conteúdo de G/C acima de 54%. A especificidade do gene de todos os primers foi confirmada usando pesquisas BLAST na sequência genômica de BR 10280^T no NCBI.

Tabela 1. Primers específicos desenhados a partir do genoma da estirpe BR 10280^T

Genes	Primers	Sequência 5'-3'
<i>nifD1</i>	nifD1f	TTTCGGTCATCTCGAGGGCG
	nifD1r	TGCTTCGAGCTCAGCCAGCG
<i>nifD2</i>	nifD2f	GACAAGGTCAACCCGGAGGC
	nifD2r	CGCTTCCAACCTCGGCGAGGC
<i>nifH1</i>	nifH1f	GGTGCAGCATGCAGAGCTACGC
	nifH1r	CGACGATTGATTCATCCACGGG
<i>nifH2</i>	nifH2f	TATCGTTCAGCACGCTGAGCTG
	nifH2r	TCTTGCCGATCTGGCTTTCG
<i>rpoB</i>	rpoBf	TGGCGCAGCAGACATTCACC
	rpoBr	GGGCTCGTCGACCATCAGGA
<i>rpoD</i>	rpoDf	TCTTGCCGTCCGACCAGACC
	rpoDr	GGTGACGGCCTTCTGGGTGA
<i>gyrD</i>	gyrDf	GTCCTCAACGAGGCGCTCCA
	gyrDr	GGCAGCGAGGAGACCGACAG

4.4.7.3 qPCR para calibração dos primers

qPCR

As reações de qPCR foram feitas usando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o reagente QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). As reações de qPCR foram realizadas em volume de 15 μL (completado com água) e consistiram de 7,5 μL de SYBR Green Master Mix, 125 nM de cada *primer* e 5 μL de amostras de DNA genômico diluído em série (base 10) de 10 a 0,0001 ng por reação (seis pontos de diluição). As condições de PCR foram: 3 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 45 s a 95 °C e 45 s a 60 °C. Todas as análises de qPCR foram realizadas usando três réplicas biológicas e duas técnicas.

Curva de calibração

Para confecção de curva de calibração, os valores de Ct obtidos das reações de qPCR através das diluições de DNA genômico da estirpe BR 10280^T foram relacionados com o número de cópias de fragmento do gene alvo em cada reação. Com a curva é possível obter a eficiência de amplificação (E), o slope e o coeficiente de determinação (R^2) de cada primer e determinar a sua confiabilidade. A eficiência de amplificação (E) foi calculada com a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$, onde slope é o coeficiente 'a' da função gerada pela reta do gráfico. Já o coeficiente de determinação (R^2) representa a estabilidade dos primers (JOHNSON et al., 2013).

Para o cálculo de número de cópias dos genes alvos amplificados foi utilizado a fórmula: $\text{N}^\circ \text{ cópias} = (\text{X (ng)} \times 6,0221 \times 10^{23} \text{ (moléculas.mol}^{-1}\text{)}) \div (\text{N (pb)} \times 660 \text{ (g.mol}^{-1}\text{)} \times 10^9 \text{ (ng.g}^{-1}\text{)})$

Onde, $\text{N}^\circ \text{ cópias}$ se refere ao número de cópias do gene de interesse amplificado, X é a quantidade total de DNA genômico usado na reação, em nanograma (ng); $6,0221 \times 10^{23}$ é a constante de Avogadro; N representa o comprimento total do genoma da estirpe estudada, em pares de base (pb); 660 é a massa média em g de 1 mol de DNA dupla fita; e 10^9 é para transformar a massa do genoma, de grama (g) para nanograma (ng).

4.4.7.4 RT-qPCR com cDNA

A quantificação relativa de RT-qPCR é usada para detectar mudanças na expressão dos genes de interesse em relação a um gene de referência, que geralmente é um gene *housekeeping*. A RT-qPCR foi realizada no sistema de PCR 7500 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o QuantiTect® SYBR® Green PCR (QIAGEN). A reação de PCR para um volume final de 15 μL consistiu de 7,5 μL de SYBR Green, 125 nM de cada primer e 5,0 μL de cDNA diluído 1:5. O ciclo foi realizado de acordo com as condições de calibração do primer descrito no item 4.4.7.3. Todos os ensaios de RT-qPCR foram realizados utilizando três repetições biológicas com três repetições técnicas, além de um controle sem amostra.

O método de análise de expressão gênica comparativa é baseado nas diferenças em Ct entre os genes alvo e o de referência e normaliza a expressão gênica para uma amostra. Portanto, a seguinte fórmula forneceu o ΔCt :

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct do gene alvo} - \text{Ct de gene de referencia}$$

O $\Delta\Delta\text{Ct}$ foi obtido pela fórmula: $\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Genes de Fixação Biológica de Nitrogênio e Clusters de Genes *nif* Simbióticos e Não Simbióticos

De todas as 221 sequências genômicas de *Bradyrhizobium* spp. obtidas, em 47 estirpes nenhum dos genes *nifH*, *nifD* ou *nifK* foram identificados, três estirpes possuem um genoma incompleto e 15 não foram estudadas devido a problemas com a qualidade do genoma, restando 156 estirpes (Anexo 4). A análise das 156 estirpes restantes mostrou que as estirpes DOA9, *B. guangxiense* CCBAU 53363^T e *B. sacchari* BR 10280^T possuem duplicatas dos três genes estruturais (*nifHDK*) da nitrogenase. Essas três estirpes são membros do supergrupo *B. japonicum* (Figura 4; Figura 5). No entanto, a duplicação do gene *nifH* foi observada somente em um total de nove estirpes, além das três já mencionadas: *B. centrolobii* BR 10245^T, *B. neotropicalis* BR 10247^T, *Bradyrhizobium* sp. S23321, *Bradyrhizobium* sp. TM124 (também do supergrupo de *B. japonicum*) e *B. oligotrophicum* S58^T, *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, *Bradyrhizobium* sp. ORS 278, *Bradyrhizobium* sp. TM122 e *Bradyrhizobium* sp. ORS 285 (supergrupo de *B. fotossintético*). Todas essas estirpes possuem também o gene *nifV*, que codifica homocitrato, essencial para FBN em vida livre (NOUWEN et al., 2017), uma vez que a própria bactéria terá que produzir homocitrato nessa condição. Curiosamente, todas as estirpes relacionadas ao supergrupo de *Bradyrhizobium* fotossintéticos, considerando as que tiveram boa qualidade na anotação do genoma, apresentaram duplicata do gene *nifH*. Mesmo assim, esse evento não é exclusivo desse supergrupo, pois sete estirpes que possuem duplicata do gene *nifH* foram classificadas como componentes do supergrupo *B. japonicum* (Figura 4; Figura 5). Piromyou et al. (2015) sugerem que as condições ambientais e / ou habitat têm impulsionado continuamente a evolução da interação planta-*Bradyrhizobium*. Por outro lado, essas singularidades nos genes *nif* em estirpes que possuem capacidade de FBNV foram observados apenas em estirpes que compõem o superclado *B. japonicum* e fotossintético, que estão estreitamente relacionados filogeneticamente (Figura 4).

Analisando os *clusters* de genes *nif* em algumas estirpes que possuem capacidade de FBNV e de estirpes que realizam FBN em simbiose, foi observado que os clusters desses dois grupos de genes *nif* se diferenciam quanto ao conteúdo GC% (Tabela 2). Com isso, foi confirmado que as estirpes não simbióticas possuem os clusters de genes *nif* em regiões com um conteúdo GC% próximo à média de todo genoma, enquanto as estirpes simbióticas geralmente carregam um cluster de genes *nif* com um conteúdo GC% menor (Figura 5; Tabela 2). Em muitos *Bradyrhizobium* spp. simbióticos os clusters de genes *nif* estão localizados em ilhas simbióticas, caracterizadas por um conteúdo GC% reduzido em relação à média do genoma (KANEKO et al., 2002; OKUBO et al., 2016). Portanto, neste estudo, o termo cluster de gene *nif* 'simbiótico' (SC) será usado para clusters em ilhas simbióticas com teor de GC% reduzido, enquanto o termo cluster de gene *nif* 'não simbiótico' (NSC) será utilizado para aqueles não localizados em ilhas com menor conteúdo GC% (Tabela 2).

Estirpes não simbióticas e estirpes do supergrupo fotossintético frequentemente carregam clusters de genes *nif* com um conteúdo de GC% indistinguível da média do genoma e esses clusters foram postulados como ancestrais para clusters simbióticos (OKUBO et al., 2016). Aparentemente, apenas as estirpes do superclado fotossintético que nodulam *Aeschynomene* são uma exceção a esta regra, porque seus clusters *nif* têm um conteúdo GC% semelhante à média de seus genomas. Como exemplo pode ser citadas as estirpes Btai1 e ORS 278 que possuem seus genes *nif* em um NSC e são do supergrupo de *Bradyrhizobium* fotossintéticos, mas nodulam plantas do gênero *Aeschynomene*, sendo classificadas como simbioses de planta (GIRAUD et al., 2007).

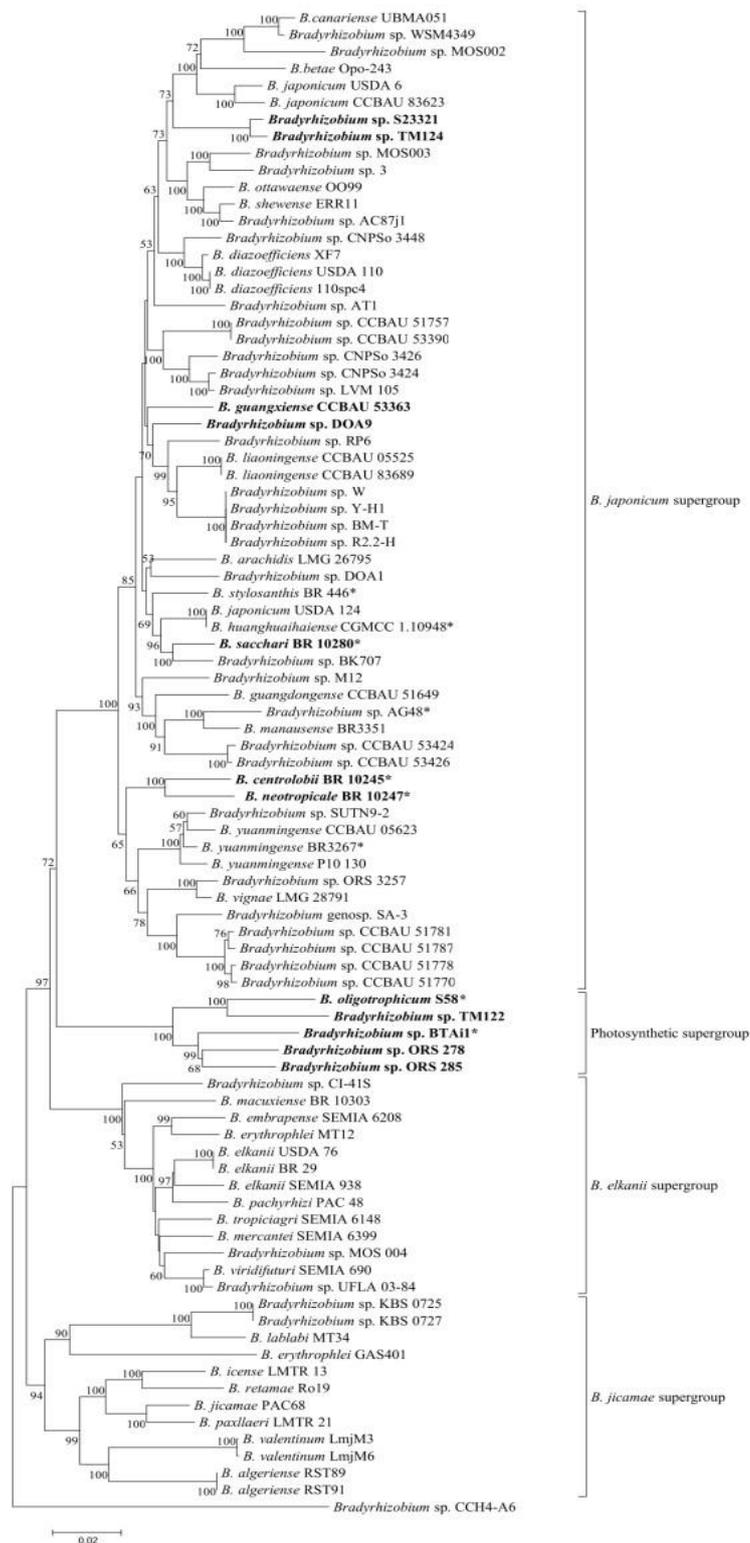


Figura 4. Relação filogenética de estirpes de *Bradyrhizobium*. Filograma estimado pelo método Neighbor-Joining (NJ) a partir de 5387 posições de pares de bases dos genes concatenados *recA* (1076), *glnII* (1010), *dnaK* (1881) e *atpD* (1420). Os valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudoreplicados. A árvore NJ foi obtida usando o modelo de Kimura 2-parameter. As estirpes com duas cópias do gene *nifH* são mostradas em negrito e as estirpes testadas quanto à atividade da nitrogenase em condição de vida livre estão marcadas (*). A barra de escala representa o número de substituições de pares de bases por local. As análises foram conduzidas em MEGA7.

Ainda, avaliando a organização dos genes em SC e NSC, foi observado que, com exceção de *B. sacchari*, as estirpes que possuem duplicata do gene *nifH* apresentaram apenas uma das cópias em sequência ao gene *nifQ* em seu genoma. *B. guangxiense* CCBAU 53363 também possui as duas cópias de *nifH* em sequência com *nifQ*, mas uma delas se localiza no plasmídeo e não no cromossomo. Outro caso particular é o da estirpe DOA9, que possui gene *nifH* cromossomal em sequência com *nifQ*, enquanto o *nifH* plasmidial não fica em sequência com *nifDK* ou *nifQ*. Em *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, que apresenta capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio eficiente em soja, mas sem capacidade de ativar a nitrogenase *in vitro*, o seu gene *nifH* fica em sequência com *nifQ* (Figura 2). Isso suporta a hipótese de que a organização dos genes estruturais da nitrogenase não possui influência quanto à capacidade de uma estirpe do gênero *Bradyrhizobium* realizar a FNVL ou a FBN em simbiose. Entretanto, a organização dos genes *nif* apresentados mostra uma forte relação entre os NSC presentes em estirpes de *B.* fotossintético e os das estirpes *B. sacchari* BR 10280, *B. cosmicum* S23321, *B. guangxiense* e DOA9 (Figura 2). As estirpes M12 e AG48 não possuem duplicata de seus genes *nif*, mas possuem a organização e os mesmos genes que estão presentes em *Bradyrhizobium sacchari* NSC. Todos os NSCs analisados, ao contrário dos SCs, foram caracterizados pela presença de genes *sufBCDSE*, logo a montante dos genes *nifDK* (Figura 2). Além disso, o gene regulador *nifA* em *Bradyrhizobium* está sempre adjacente aos genes estruturais da nitrogenase nos NSCs, ao passo que está sempre mais distante nos SCs (Figura 2; Tabela 8). Os genes *Suf* estão envolvidos na biossíntese do cluster ferro-enxofre (TAKAHASHI & TOKUMOTO, 2002), enquanto o *nifA* codifica um regulador-chave da transcrição dos genes *nif* (DIXON & KAHN, 2004). A observação deste estudo de que a organização do gene dentro de SCs difere sistematicamente de NSCs dentro de supergrupos *B. japonicum* e fotossintéticos apoia a ideia de que esses clusters foram adquiridos horizontalmente.

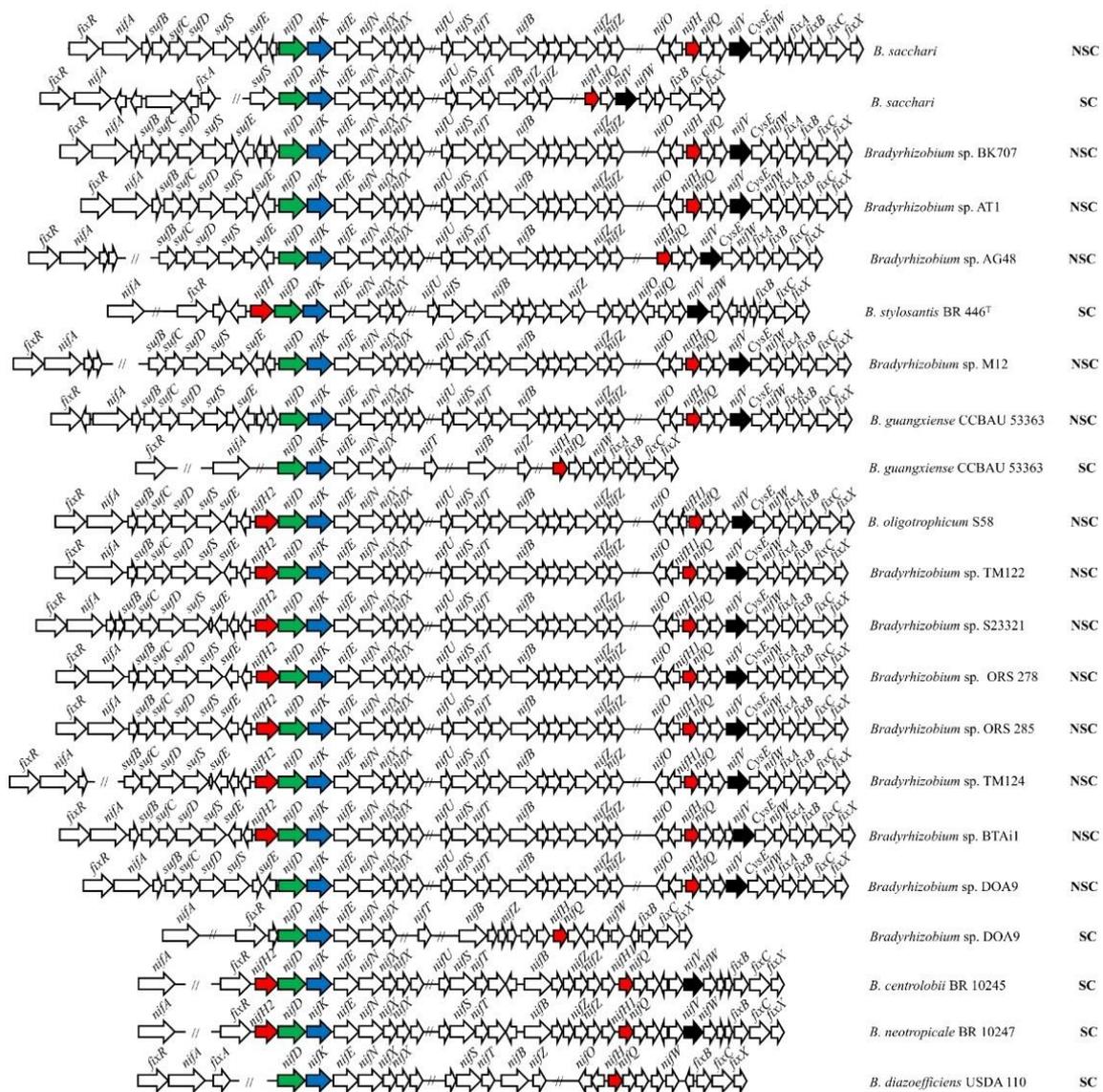


Figura 5. Organização de clusters de genes de fixação de nitrogênio em estirpes representantes e espécies de supergrupos *B. japonicum* e fotossintéticos. Os genomas foram anotados usando RAST e a organização do gene foi estudada usando Artemis. Os genes *nifHDKV* são codificados por cores para facilitar a visualização comparativa. Clusters de genes *nif* simbióticos (SC) ou não simbióticos (NSC) de acordo com a Anexo 4. Para *B. sacchari*, foi utilizado o genoma da estirpe BR 10556. A interrupção das linhas horizontais significa que os genes estão em contigs separados.

Tabela 2. Características de cluster de genes *nif* em estirpes representativas selecionadas de supergrupos de *B. japonicum* e fotossintéticos.

Estirpe	replicon GC%	<i>nif</i> -cluster GC%	Cluster (SC/NSC)*	<i>nif</i> cluster início/fim	<i>nif</i> -cluster size (pb)	distancia cluster- <i>nifA</i> (pb)**
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	63.2	59.8	SC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	29220	contigs separados
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	64.1	57.2	SC	<i>fixX</i> - <i>nifD</i>	27260	265739
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	63.7	58.6	SC	<i>fixX</i> - <i>sufB</i>	37215	444086
<i>B. guangdogense</i> CCBAU 51649 ^T	63.8	63.6	NSC	<i>fixR</i> - <i>sufE</i>	8763	adjacente
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T chromosome	64.5	64.4	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	44148	adjacente
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T plasmid	59.3	58.5	SC	<i>fixX</i> - <i>nifA</i>	35733	14102
<i>B. huanghuaihaiense</i> CGMCC 1.10948 ^T	63.9	57.2	SC	<i>fixX</i> - <i>nifD</i>	27253	contigs separados
<i>B. neotropicales</i> BR 10247 ^T	63.6	59.8	SC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	29516	contigs separados
<i>B. oligotrophicum</i> S58 ^T	65.1	64.3	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	47311	contigs separados
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	63.8	58.1	SC	<i>fixX</i> - <i>sufB</i>	35261	contigs separados
<i>B. sacchari</i> BR10280 ^T NSC	63.8	63.6	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	43268	adjacente
<i>B. sacchari</i> BR10280 ^T SC	63.8	57.3	SC	<i>fixX</i> - <i>sufS</i>	32838	contigs separados
<i>Bradyrhizobium</i> sp. AG48	63.7	63.7	NSC	<i>fixX</i> - <i>sufB</i>	38476	contigs separados
<i>Bradyrhizobium</i> sp. AT1	64.2	63.21	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	43904	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BK707	64.3	63.7	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	44228	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Btai1	64.8	64.3	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	47305	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9 chromosome	64.5	64.7	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	43306	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9 plasmid	64.5	60.0	SC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	45462	49819
<i>Bradyrhizobium</i> sp. M12	64.3	64.1	NSC	<i>fixX</i> - <i>sufB</i>	39934	contigs separados
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	65.5	64.57	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	49395	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 285	65.2	64.48	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	47521	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321	64.3	63.1	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	45184	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. TM122	64.9	63.9	NSC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	47400	adjacente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. TM124	64.4	63.3	NSC	<i>fixX</i> - <i>sufB</i>	40788	contigs separados
<i>B. stylosantis</i> BR446 ^T	64.6	57.1	SC	<i>fixX</i> - <i>fixR</i>	31186	96466

* Os clusters de genes *nif* foram classificados como SC quando seu conteúdo de GC% estava substancialmente abaixo (3,4% ou mais) da média do genoma. ** quando possível, a distância (adjacent ou em pb-pares de base) do primeiro gene estrutural da nitrogenase (*nifH* ou *nifD*, ver Figura 5) do cluster de gene *nif* para o gene regulador *nifA* foi determinada. Conforme indicado, para alguns genomas isso não foi possível porque os genes foram localizados em contigs separados.

4.5.2 Filogenia do Gene *nifH*

A análise filogenética de todas as sequências do gene *nifH* de *Bradyrhizobium* disponíveis mostrou que os genes *nifH* duplicados são geralmente pouco divergentes (7% de divergência de sequência de nucleotídeos ou menos) entre si e se agrupam na árvore filogenética, sugerindo que essas duplicatas são provavelmente parálogas (Figura 6; Tabela 3). Nas estirpes DOA9 e *B. guangxiense* CCBAU 53363T com dois clusters completos de genes *nif*, um NSC e outro SC, os homólogos *nifH* são pouco divergentes (9,1 e 13,5%, respectivamente). Entretanto, os genes *nifH* duplicados em *B. sacchari* apresentam 19,3% de dissimilaridade da sequência de nucleotídeos e são filogeneticamente distantes (Figura 6; Tabela 3). O que mostra que a maior divergência na sequência de nucleotídeos de cópias de genes está presente quando os genes estão em clusters diferentes. Por outro lado, as poucas espécies / estirpes disponíveis com ambos NSC e um SC (*B. sacchari*, *B. guangxiense* e estirpe DOA9) mostraram níveis variados de divergência de sequência entre os parálogos. No caso do DOA9, a proximidade filogenética dos homólogos do gene *nifDK* levou Okubo et al. (2016) a sugerirem que as cópias simbióticas são parálogas dos genes *nifDK* ancestrais não simbióticos, que evoluíram para um conteúdo de GC% inferior. No entanto, no caso de *B. guangxiense* e principalmente no caso de *B. sacchari*, a distância filogenética entre os homólogos de genes *nif* individuais em NSCs e SCs é maior. Além disso, a organização gênica dentro dos NSCs parece ser bastante conservada entre as espécies, enquanto a organização gênica dos SCs é sistematicamente diferente, o que também parece favorecer um papel de transferência horizontal na aquisição desses *clusters* NSCs. Segundo TEULET et al. (2020), as ilhas simbióticas com conteúdo de GC% divergente são geralmente consideradas indicativas de transferência horizontal de genes.

Tabela 3. Estimativas de divergência evolutiva entre sequências de cópia do gene *nifH* presentes em estirpes de *Bradyrhizobium*.

Estirpes	Divergência entre cópias de gene <i>nifH</i> (%)
<i>B. sacchari</i> BR 10280	19,3
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363	13,5
<i>B. sp.</i> DOA9	9,1
<i>B. centrolobii</i> BR 10245	7,0
<i>B. neotropicae</i> BR 10247	7,0
<i>B. sp.</i> S23321	5,3
<i>B. sp.</i> TM124	5,0
<i>B. sp.</i> BTai1	4,0
<i>B. sp.</i> ORS 285	3,3
<i>B. sp.</i> TM122	2,9
<i>B. sp.</i> ORS 278	2,4
<i>B. oligotrophicum</i> S58	1,6

As análises foram conduzidas usando o modelo Tamura 3-parâmetros. As posições de códon incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + Não codificantes. Havia um total de 851 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7.

A análise filogenética conduzida para as sequências dos genes *nifH* (Figura 6) e *nifDK* concatenados (Anexo 5) presentes nas espécies do gênero *Bradyrhizobium* mostrou o mesmo padrão de filogenia. Os genes *nifH* de NSCs agrupam-se em clados estreitamente relacionados, independentemente da distância filogenética entre as estirpes com base na análise de MLSA (Figura 4; Figura 6). Uma filogenia semelhante foi observada ao usar genes *nifDK* concatenados (Anexo 5). Portanto, nesse trabalho esses clados filogenéticos serão referidos como clados do gene *nif* 'NSC'. Em contraste com os genes *nif* 'NSC', os genes *nifHDK* de SCs são filogeneticamente muito mais diversos e distribuídos por todo o espectro filogenético (Figura 4; Figura 6; Anexo 5). As estirpes não simbióticas de cana-de-açúcar AG48 e M12 agruparam-se no cluster do gene *nif* NSC, bem como no cluster do gene *nif* NSC de *B. sacchari*. Os genes *nifHDK* destas espécies estavam distantes, o que está de acordo com o baixo nível de identidade de sequência entre os genes homólogos dos NSC e SC (Figura 5; Tabela 3; Anexo 5). Pode-se especular que a retenção de SC e NSC fornece um benefício competitivo para *B. sacchari* para colonizar ambiente oligotrófico de solo-planta onde hospedeiros simbióticos (leguminosas) ou não simbióticos (cana-de-açúcar) podem estar disponíveis alternadamente.

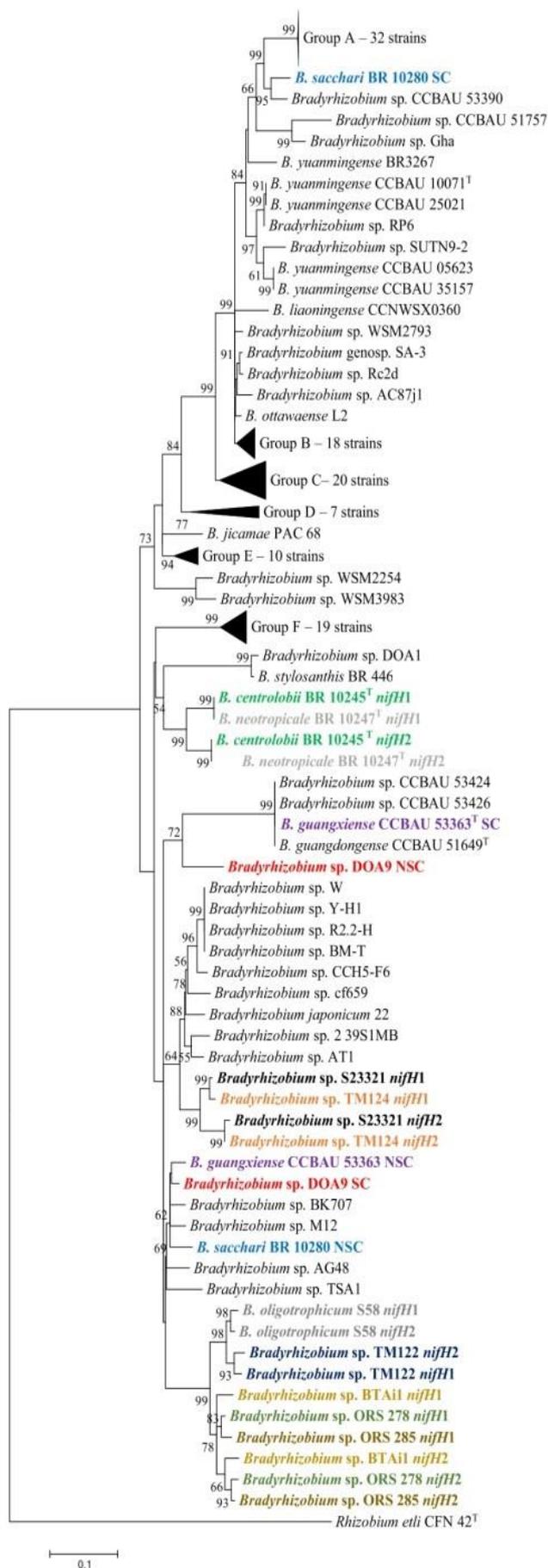


Figura 6. Relações filogenéticas de todos os genes *nifH* identificados em sequências de genoma disponíveis de estirpes de *Bradyrhizobium*. Filograma estimado pelo método de Maximum Likelihood (ML) a partir de 868 posições de pares de bases. Os valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudoreplicados. A árvore ML foi obtida usando o modelo Tamura de 3 parâmetros. A barra de escala representa o número de substituições de par de bases por site. *Rhizobium etli* CFN 42T (NC_004041) foi usado como grupo externo. Nomes em negrito e da mesma cor representam homólogos *nifH* da mesma linhagem. Alguns clados colapsados são representados com as letras A a F e as respectivas estirpes podem ser encontradas no Anexo 1. As análises foram conduzidas no Mega 7.

4.5.3 Atividade da Nitrogenase

Baseado nas filogenias construídas para os genes *nifH*, *nifDK* concatenados e taxonômicos, foi realizado um experimento com algumas estirpes que carregam cluster *nif* SC, NSC ou ambos, quanto à atividade de nitrogenase em vida livre. Confirmando a importância dos NSCs no FNVL, apenas as estirpes portadoras de um NSC apresentaram atividade da nitrogenase em meio de cultura (Figura. 5; Tabela 2; Figura 7). Algumas espécies brasileiras recentemente descritas com um único SC (*B. stylosanthis* BR 446^T, *B. centrolobii* BR 10245^T e *B. neotropicalis* BR 10247^T) não apresentaram FNVL, embora seus SCs contenham o gene *nifV* considerado determinante para habilitar FNVL (NOUWEN et al., 2017). Isso indica que outros componentes genéticos são importantes e que a simples presença de *nifV* não necessariamente permite FNVL. Algumas dessas estirpes (*B. centrolobii* BR 10245^T e *B. neotropicalis* BR 10247^T) também possuem duas cópias de *nifH*, no entanto ambas posicionadas fora do clado NSC. Esse resultado sugere que os NSCs são determinantes para a atividade da nitrogenase de vida livre em *Bradyrhizobium* spp..

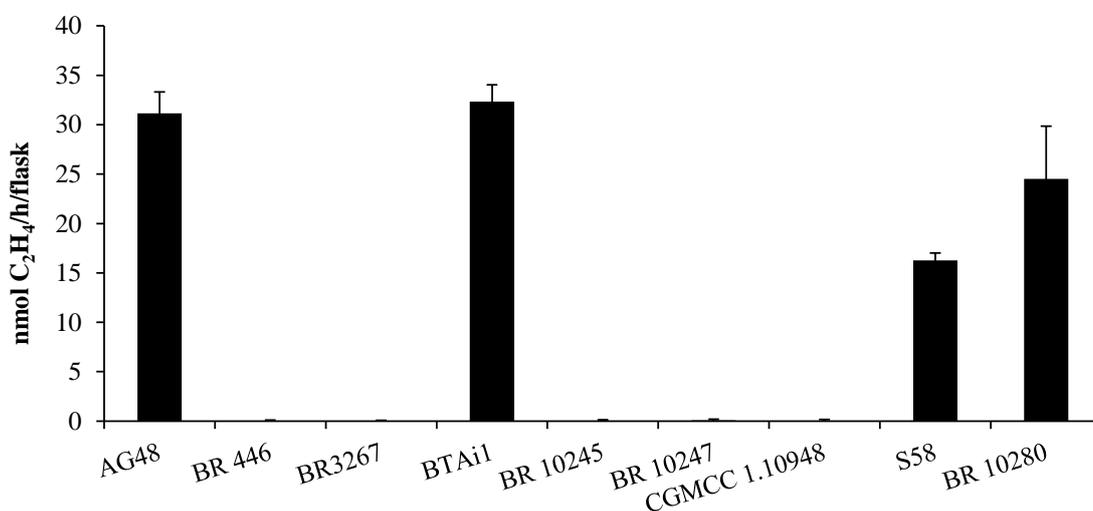


Figura 7. Atividade da nitrogenase de vida livre de diversas estirpes de *Bradyrhizobium* portadoras ou não de um NSC. As estirpes foram cultivadas em meio JMV semissólido modificado e a atividade da nitrogenase foi avaliada pelo ensaio de redução do acetileno sete dias após a inoculação. A atividade da nitrogenase foi medida como nmol de C₂H₄ produzido a partir de gás acetileno por hora por frasco. Estirpes portadoras de um NSC: *Bradyrhizobium* sp. AG48, *Bradyrhizobium* sp. Btai1, *B. oligotrophicum* S58^T e *B. sacchari* BR 10280^T. Estirpes carregando apenas um SC: *B. stylosanthis* BR 446^T, *B. yuanmingense* BR3267, *B. centrolobii*

BR 10245^T, *B. neotropica* BR 10247^T e *B. huanghaihaiense* CGMCC 1.10948^T. Barras indicam erro padrão, n = 3.

4.5.4 Extração de RNA e Obtenção do cDNA

As amostras colhidas com a estirpe BR 10280 em condição de FNVL e simbiose passaram por extração de RNA, tratamento com DNase e quantificação. Após verificação da qualidade e quantificação do RNA total obtido (Figura 8; Tabela 4) as reações de transcrição reversa foram preparadas e o cDNA obtido foi utilizado nas reações de RT-qPCR.

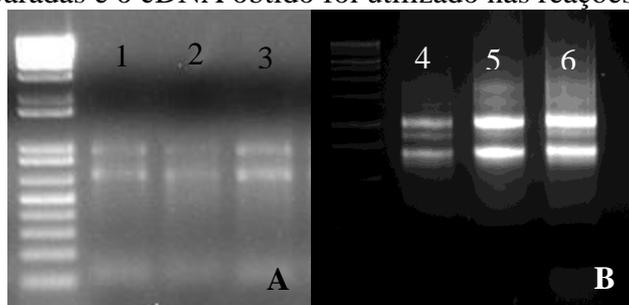


Figura 8. Imagens de géis de agarose 2% com amostras de RNA extraídos de cultura crescida em condição de FNVL (A) e simbiose (B). 1 a 3- amostras de meio semissólido; 4 a 6- amostras de nódulos.

Tabela 4. Leitura em fluorímetro Qubit® em **ng/μL** do RNA total extraído das amostras coletadas nos três experimentos usados para estudo de expressão genica em diferentes estilos de vida de *Bradyrhizobium sacchari* BR 10280.

Amostra/repetição	RNA - nódulo (ng/μL)	RNA - meio semissólido (ng/μL)
1	324	35
2	754	37
3	1000	38

4.5.5 Curva Padrão dos Primers

A eficiência de amplificação (E) dos primers específicos para os genes da estirpe BR 10280^T, estão dentro da faixa aceitável, que segundo Johnson et al. (2013) é entre 90 e 105%. A eficiência de amplificação é avaliada pela capacidade de um primer dobrar a quantidade de fragmento da região alvo a cada ciclo da reação (KRALIK & RICCHI, 2017) e pode ser determinada utilizando em qPCR um molde diluído em serie para gerar pontos de um gráfico de regressão linear pela a sua relação entre os valores de Ct e o log do número de cópias de fragmentos amplificado do gene alvo na reação de qPCR, na formula da eficiência é utilizado o slope (inclinação), que para permitir que a eficiência esteja dentro da faixa a aceitável, deve estar entre -3,2 e -3,5 (JOHNSON et al., 2013). Utilizando o mesmo gráfico foi verificado que os primers apresentaram coeficiente de determinação (R²) dentro da faixa aceitável, sendo entre 0,98 e 1. O coeficiente de determinação demonstra a estabilidade dos primers (JOHNSON et al., 2013). Os valores de eficiência de amplificação, slope e coeficiente de determinação estão na tabela 5.

Tabela 5. Valores de eficiência (E), slope e coeficiente de determinação (R^2) dos primers específicos para genes da estirpe BR 10280^T utilizado em experimento de qPCR.

	nifH1f/r	nifH2f/r	nifD1f/r	nifD2f/r	gyrD1f/r	rpoDf/r	rpoBf/r
E	0.99	0.94	1.02	0.99	0.93	0.99	0.94
Slope	-3.3	-3.4	-3.3	-3.3	-3.5	-3.3	-3.5
R²	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99

4.5.6 Expressão Relativa de Genes *nif* em Diferentes Estilos de Vida

Os níveis de transcrição para as cópias dos genes *nifH* e *nifD* foram quantificados por RT-qPCR pelo método comparativo, onde o gene *rpoD* foi selecionado entre os genes *housekeeping* para servir de referência de acordo com os parâmetros da tabela 5.

A figura 9 mostra os níveis de expressão relativa entre os genes *nifH* e *nifD* do NSC e SC de *B. sacchari* BR 10280^T, em condição de FNVL ou simbiose, em relação ao gene de referência *rpoD*. Embora os níveis totais de transcrição de ambos os genes *nifH* sejam mais altos em condições simbióticas, quando observados em condições de FNVL, o nível de transcrição do *nifH* do NSC foi sete vezes maior de que o observado no *nifH* presente no SC. A diferenciação funcional entre duplicatas do gene *nifH* também foi encontrada em *Azorhizobium caulinodans*, outra espécie capaz de FNVL e em simbiose (IKI et al., 2007).

Já os níveis de transcrição das cópias de *nifD*, parecem ser mais afetados pela condição do ambiente que pela origem da cópia do gene. Isso porque seus níveis de transcrição em condição de FNVL é menor do que em condição de simbiose, mas sem muita diferença (Figura 9). Além disso, comparando os níveis de transcrição das cópias de *nifD* com as de *nifH* nas mesmas condições, o primeiro, apresenta níveis maiores. O que indica que as duas cópias do gene *nifD* participam em ambas condições de FBN. Os resultados obtidos por Wongdee et al. (2016) usando mutagênese na estirpe DOA9, mostraram que os genes *nifDK* localizados no cromossomo (em um NSC) eram importantes para FNVL e em simbiose e sugeriram que um segundo conjunto de *nifDK* plasmídico (SC) estava relacionado à FBN em simbiose. Os resultados obtidos no presente estudo se alinham com os de Wongdee et al. (2016), com a diferença de que ambas as cópias de *nifD* parecem ser altamente expressas nas duas condições de FBN em ambos os ambientes (vida livre e simbiose).

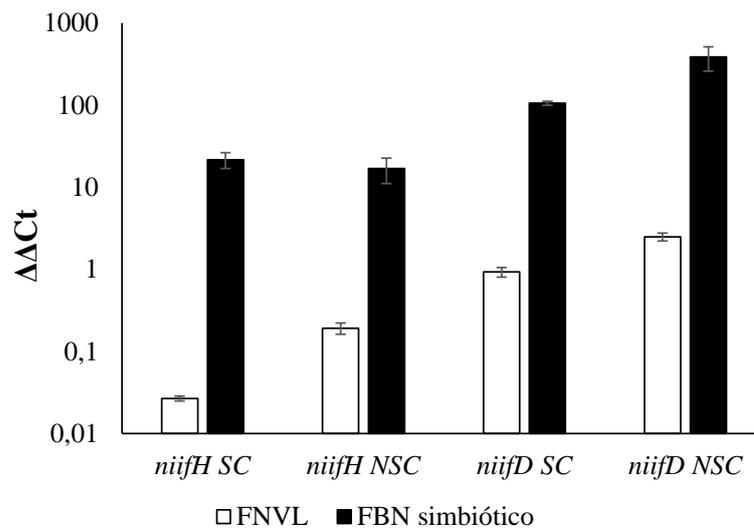


Figura 9. Expressão relativa dos homólogos dos genes *nifH* e *nifD* dos NSC e SC de *Bradyrhizobium sacchari* BR10280^T durante o crescimento sob condições FLNF (em meio JMV semissólido) ou sob condições FN simbiótica (dentro de nódulos ativos de *Vigna unguiculata*). Os níveis de transcrição foram quantificados usando RT-qPCR com primers específicos dos genes e cDNA produzido usando primers hexaméricos aleatórios. Foi utilizado o método do limiar comparativo ($\Delta\Delta C_t$) e o gene *rpoD* foi utilizado como referência. Os resultados são baseados em valores médios de duas duplicatas técnicas e as barras indicam o erro padrão (SE) para três repetições biológicas ($n = 3$).

Não foi possível determinar o motivo das cópias do gene *nifD* manterem um nível de transcrição relativamente maior que do gene *nifH*. Devido ao método utilizado para sequenciar o genoma da estirpe BR 10280^T, também não foi possível distinguir DNA cromossômico de plasmídeos. Portanto, não é possível saber se os seus dois clusters de genes *nif* se localizam no cromossoma ou se há clusters de genes *nif* em plasmídeos como no caso de *B. guangxiense* e da estirpe DOA9. Mais estudos serão necessários para responder essas questões.

4.6 CONCLUSÕES

Nas espécies dos clados de *Bradyrhizobium japonicum* e fotossintéticos ocorrem dois tipos de clusters de genes *nif*, um simbiótico (SC) e outro não simbiótico (NSC), que podem ser separados nos supergrupos filogenéticos de *Bradyrhizobium japonicum* e fotossintético através de seus conteúdos GC% e organização dos genes.

O *cluster* de genes *nif* não simbiótico esteve mais envolvido na FBN em condição de vida livre, uma vez que a expressão de seus genes foi maior nestas condições em comparação com o homólogo *nifH* SC.

5 CAPÍTULO III

DESEMPENHO DE RIZÓBIOS INOCULADOS EM MINITOLETES DE CANA-DE- AÇÚCAR CULTIVAR RB867515

5.1 RESUMO

Relatos sobre a capacidade do gênero *Bradyrhizobium* contribuir com o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em associação com cana-de-açúcar, serviram de suporte para o isolamento de uma coleção de estirpes desse gênero a partir de raízes de cana-de-açúcar. O presente estudo objetivou selecionar estirpes dessa coleção com potencial para promover o crescimento da cana-de-açúcar cv. RB867515. Para identificar potenciais estirpes promotoras de crescimento para teste em campo, um experimento (30 dias) foi realizado usando representantes dessa coleção para a inoculação de mini toletes de cana-de-açúcar, que foram cultivados em casa de vegetação em vasos com solo. Nesse ensaio, destacou-se a inoculação com a estirpe AG48 no teor de clorofila (incremento de 16,33%), a inoculação com P7-6 no volume, massa seca e fresca de raízes (incrementos de 21,1%, 36,8% e 24,52%, respectivamente) e a inoculação com RBR134b no incremento da área foliar (incremento de 36,6%). Essas estirpes (AG48, P7-6 e RBR134b), juntamente com P5-2 (*Rhizobium* sp. BR 10268), P9-20 (=BR 10280^T) e *Nitrospirillum amazonense* BR11145 foram inoculados individualmente em mini toletes de cana-de-açúcar para produção de mudas que foram transplantadas para o campo sob tratamentos com baixa e alta dose de N para avaliação dos parâmetros de produtividade em cana planta e primeira soca. Aos 85 dias após o transplântio (DAT) para o campo, a inoculação com P7-6 promoveu incremento significativo na área foliar de cana-de-açúcar, enquanto todos os tratamentos inoculados foram superiores ao controle não inoculado sob 40 kg/ha de N para a altura da parte aérea. As plantas inoculadas com a estirpe BR11145 apresentaram a maior média de produtividade. Esses dados sugerem que *Bradyrhizobium* spp. possuem potencial para uso biotecnológico na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. Experimentos adicionais com avaliação do ciclo completo da cana planta são necessários para determinar a capacidade de incremento de produção pela inoculação da estirpe P7-6 de *Bradyrhizobium*, uma vez que não foi possível coletar esses dados no presente estudo.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, mudas pré brotadas, promoção de crescimento.

5.2 ABSTRACT

Reports on the capacity of the genus *Bradyrhizobium* to contribute to the biological nitrogen fixation (BNF) process in association with sugarcane served as support for the isolation of a collection of strains of this genus from sugarcane roots. The present study aimed to select strains from this collection with potential to promote the growth of sugarcane cv. RB867515. To identify potential growth-promoting strains for field testing, an experiment (30 days) was carried out using representatives from this collection for the inoculation of sugarcane mini-set, which were cultivated in a greenhouse in pots with soil. In this trial, the inoculation with strain AG48 was highlighted in the chlorophyll content (increase of 16.33%), the inoculation with P7-6 in the volume, dry and fresh weight of roots (increments of 21.1%, 36, 8% and 24.52%, respectively) and inoculation with RBR134b to increase leaf area (increase of 36.6%). These strains (AG48, P7-6 and RBR134b), together with P5-2 (*Rhizobium* sp. BR 10268), P9-20 (=BR 10280^T) and *Nitrospirillum amazonense* BR11145 were inoculated individually in sugarcane mini-set for production seedlings that were transplanted to the field under treatments with low and high doses of N for evaluation of productivity parameters in sugarcane plant and first ratoon. At 85 days after transplanting (DAT) to the field, inoculation with P7-6 promoted a significant increase in sugarcane leaf area, while all inoculated treatments were superior to the uninoculated control under 40 kg/ha of N for the height of the aerial part. Plants inoculated with strain BR11145 showed the highest average yield. These data suggest that *Bradyrhizobium* spp. have potential for biotechnological use in the production of pre-sprouted sugarcane seedlings. Additional experiments with evaluation of the complete cycle of the sugarcane plant are needed to determine the capacity to increase production by inoculating the *Bradyrhizobium* strain P7-6, since it was not possible to collect these data in the present study.

Keywords: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, pre-sprouted seedlings, growth promotion.

5.3 INTRODUÇÃO

Com uma área de aproximadamente 8,41 milhões de hectares ocupada com cana-de-açúcar na safra de 2020/2021 e produção de 642,1 milhões de toneladas (CONAB, 2020), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Entretanto, a produtividade dessa cultura no Brasil ainda não atingiu todo seu potencial, e a cada ano são incorporadas novas áreas para sua produção. Com o aumento das áreas de produção há uma maior demanda por insumos. Logo, diversas estratégias de manejo como, por exemplo, o desenvolvimento de produtos biológicos e aplicação de técnicas que possam potencializar os efeitos benéficos da associação de bactérias diazotróficas com a cana-de-açúcar, pode ser uma opção para essa cultura aumentar sua produção, ou no mínimo diminuir os gastos quando houver incorporação de novas áreas de produção, com a diminuição de necessidade de aplicação de fertilizantes minerais.

Com esforços direcionados na obtenção de estirpes capazes de fixar nitrogênio em associação com a cana-de-açúcar para serem usadas no sistema de produção, um inoculante com grande potencial de uso biotecnológico foi desenvolvido (REIS et al., 2009). O mesmo é composto por cinco espécies de bactérias diazotróficas endofíticas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), *Nitrospirillum amazonense* (MAGALHAES et al., 1983) e *Paraburkholderia tropica* (REIS et al., 2004). No entanto, hoje sabe-se que a comunidade microbiana que habita os tecidos da cana-de-açúcar é muito mais diversa do que se imaginava (DE SOUZA et al., 2016). Além disso, diversos mecanismos promotores do crescimento vegetal estão envolvidos na associação de bactérias endofíticas e cana-de-açúcar (DA SILVEIRA et al., 2019), o que justifica a contínua busca por novas estirpes bacterianas eficientes na promoção de crescimento da cana-de-açúcar.

Diversos estudos mostraram que os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* poderiam contribuir com uma parcela significativa da FBN associada à cana-de-açúcar (ANDO et al., 2005; BURBANO et al., 2011; THAWEENUT et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Com isso, com a utilização de dados fornecidos por técnicas moleculares como um guia para as estratégias de isolamento desses gêneros, uma coleção de bactérias predominantemente do gênero *Bradyrhizobium*, foi obtida de raízes de cana-de-açúcar (BOMAR et al., 2011; ROUWS et al., 2014). Alguns isolados dessa coleção apresentaram atividade da nitrogenase *in vitro* e capacidade de induzir a formação de nódulos ativos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e outras leguminosas (ROUWS et al., 2014; DE MATOS et al., 2017). A atividade da nitrogenase *in vitro* é um indicativo da capacidade desses isolados fixarem nitrogênio sem estarem associados a nódulos de plantas leguminosas e esta característica é essencial para FBN em gramíneas como cana-de-açúcar.

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi identificar estirpes do gênero *Bradyrhizobium* capazes de promover o crescimento de cana-de-açúcar em condições controladas e em campo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Etapas Comuns Para Experimento de Casa de Vegetação e Campo

5.2.1.2 Produção de mudas

As mudas foram produzidas a partir de minitoletes de cana-de-açúcar (cv. RB867515). Para o experimento de casa vegetação, os minitoletes foram obtidos da área experimental do grupo de pesquisa de nutrição mineral de plantas da UFRRJ em Seropédica-RJ. Para o experimento de campo os minitoletes tiveram origem da área experimental da UFRRJ, localizada em Campos dos Goytacazes-RJ. O preparo das mudas seguiu a metodologia de Landell et al. (2012). Para garantir a homogeneidade entre os tratamentos a nível de reserva equivalente até o transplante os minitoletes foram separados em três classes, de acordo com o tamanho e diâmetro. Após esta classificação, os mesmos foram distribuídos igualmente entre os tratamentos. Esse foi o método adotado para propiciar maior uniformidade no brotamento e, consequentemente, no tamanho das mudas. Dessa forma, se buscou diminuir ao máximo as fontes de variação experimental que geralmente acompanha os experimentos realizados com cana-de-açúcar. Previamente aos tratamentos de inoculação e plantio, os minitoletes foram submetidos a tratamento térmico (52 °C durante 30 minutos) e, em seguida, tratados por imersão em solução fungicida (Piraclostrobina, 1 mL L⁻¹) durante três minutos. O objetivo destes procedimentos foi diminuir a incidência de fitopatógenos.

5.2.1.2 Preparo dos inoculantes e inoculação

As estirpes do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* foram cultivadas a 28 °C em meio de cultura líquido TY (VINCENT, 1970) sob agitação de 150 rpm até a concentração aproximada de 10⁹ células mL⁻¹. As estirpes *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR 11281^T (PAL-5^T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504 = HCC103), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366^T = PPe 8^T) e *Nitrospirillum amazonense* (BR11145 = CBAMc) foram cultivadas separadamente em meio de cultura DYGS (RODRIGUES NETO, 1986) líquido por 2 dias a 30 °C até atingirem a concentração aproximada de 10⁹ células mL⁻¹.

Para a inoculação, os minitoletes de cada tratamento foram colocados em sacos plásticos contendo a solução inoculante por um período de uma hora. As soluções inoculantes foram preparadas a partir da diluição 1:100 das respectivas culturas bacterianas produzidas em meio TY em água de torneira autoclavada, para uma concentração final de 10⁶ células mL⁻¹. Os minitoletes referentes aos tratamentos não inoculados foram imersas em meio TY diluído na mesma proporção e sem a presença de bactérias.

5.2.1.3 Estatística

Inicialmente foram verificados os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias dos resíduos pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett com uso do programa R (TEAM, 2019). Em seguida as análises de variâncias e testes de comparação de médias foram realizadas com o software SISVAR (FERREIRA, 2014). As médias foram comparadas utilizando os testes t (LSD), Tukey e Scott-Knott, a 5% e 10% de significância.

5.2.2 Seleção de Estirpes Eficientes na Promoção de Crescimento de Cana-de-Açúcar em Casa de Vegetação

5.2.2.1 Estirpes utilizadas e plantio em bandejas

Para determinar a capacidade de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* promover o crescimento de cana-de-açúcar, foram selecionadas estirpes representantes de grupos genéticos componentes do microbioma de cana-de-açúcar, identificadas em trabalhos anteriores (JÚNIOR et al., 2019; MATOS, 2017; ROUWS et al., 2014) (Tabela 6).

Tabela 6. Estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas como representantes de grupos genéticos e utilizadas em experimento de inoculação em cana-de-açúcar, sob condições de casa de vegetação em vasos com solo não esterilizado.

Estirpe	Origem isolamento	Referência
AG14	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
AG48	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
IAE20b	Raiz de cana-de-açúcar	Menezes et al. (2019)
IAR216a	Rizosfera de cana-de-açúcar	Menezes et al. (2019)
M12	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
P10-5	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
P10-6	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
P1-6	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
P5-32	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
P5-5	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
P7-6	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
P9-20	Raiz de cana-de-açúcar	Rouws et al (2014)
RBR134b	Rizosfera de cana-de-açúcar	Menezes et al. (2019)

Após a inoculação, os minitoletes foram transferidos para bandejas contendo 13 kg de uma mistura esterilizada de areia com vermiculita (2:1 v/v). Para cada tratamento foi utilizada uma bandeja contendo 16 minitoletes. As bandejas foram organizadas em casa de vegetação e irrigadas com água filtrada, sempre aplicando o mesmo volume de água para todas as bandejas.

5.2.2.2 Transplântio para vasos com solo

Após 28 dias do plantio em bandejas, plantas representativas de cada tratamento foram selecionadas e cuidadosamente transplantadas individualmente para vasos (volume de um litro) preenchidos com solo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo, coletado na área experimental da Embrapa Agrobiologia. A avaliação do experimento foi realizada aos 30 dias após o transplântio (DAT).

O solo foi suplementado com nutrientes de acordo com o resultado da análise química de amostra do solo e exigências da cultura, com adição separada de superfosfato simples, cloreto de potássio, $MnSO_4$ (0,5g/L) e solução de micronutrientes para cada vaso (FRANCO & DOBEREINER, 1967). O nitrogênio (N) foi fornecido para todos os tratamentos na forma de uma solução de $(NH_4)_2SO_4$ para o equivalente a 40 kg N/ha, incluindo um controle não inoculado (N40). Além disso, outro controle não inoculado foi adicionado, mas com uma dose de N equivalente a 80 kg N/ha (N80). Portanto, o experimento consistiu na avaliação de 13 estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, um controle não inoculado com baixa dose de N (N40), um controle não inoculado com alta dose de N (N80) e um controle inoculado com o inoculante para cana-de-açúcar desenvolvido pela Embrapa, denominado de “Mix” no presente estudo, compondo o experimento os tratamentos a seguir:

1. Não inoculado N40;
2. Não inoculado N80;
3. Inoculante com cinco estirpes (Mix): *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Nitrospirillum amazonense* (BR11145) e *Paraburkholderia tropica* (BR 11366);
4. Inoculação individualizada de cada uma das 13 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de cana-de-açúcar (Tabela 6);

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com dezesseis tratamentos e oito repetições.

5.2.2.3 Variáveis analisadas em casa de vegetação

Foi avaliado o volume das raízes (por deslocamento de água) (VR), massa seca das raízes (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), diâmetro do colmo (DC) e área foliar (AF). Para a determinação do volume das raízes, o sistema radicular foi submerso individualmente em uma proveta com água e a diferença do volume de antes e após a submersão foi registrada (em mL).

Para as determinações de massa seca (sistema radicular e parte aérea), as plantas foram mantidas a 65 °C em estufa com circulação forçada de ar até atingirem massa constante e, em seguida, pesadas utilizando uma balança de precisão. O comprimento da parte aérea foi determinado a cada dois dias a partir da terceira semana após o transplântio. O diâmetro do colmo foi obtido utilizando paquímetro, com medição a dois cm da superfície.

A área foliar foi calculada a partir de dados obtidos da folha +3. Utilizando a fórmula $AF = C \times L \times 0,75 \times (N + 2)$, em que C é o comprimento da folha +3, L é a largura da folha +3, 0,75 é o fator de correção para área foliar da cultura, e N é o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde (HERMANN & CÂMARA, 1999).

5.2.3 Experimento em Campo

5.2.3.1 Área experimental

O experimento foi conduzido entre outubro de 2018 e agosto de 2020 na área experimental da Embrapa Agrobiologia (22°44'47'' S e 43°40'13'' W e 20 m de altitude) localizada no município de Seropédica-RJ. O clima da região é do tipo Aw, segundo classificação de Köppen, com inverno seco e verão quente e chuvoso. Foram avaliados os ciclos de cana planta (outubro de 2018 a setembro de 2019) e primeira soca (setembro de 2019 a agosto de 2020), que tiveram precipitação acumulada de 1467 mm e 1254 mm, respectivamente (Figura 10). Nos primeiros meses após o plantio e após o primeiro corte, a necessidade hídrica das plantas foi suprida com irrigação.

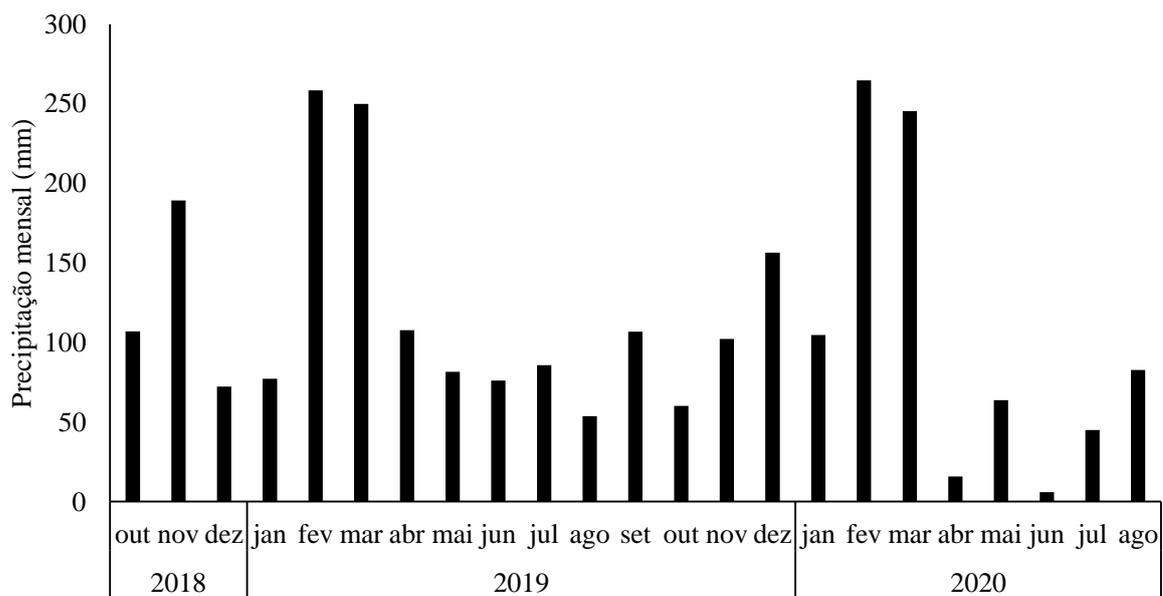


Figura 10. Precipitação mensal registrada sob a área de estudo entre outubro de 2018 e agosto de 2020. (Dados do INMET-Instituto Nacional De Meteorologia Do Brasil).

De acordo com Santos et al. (2006), o solo da área experimental foi classificado como Planossolo Háptico. Esse tipo de solo apresenta textura arenosa, o que favorece a perda de nutrientes por lixiviação, principalmente N e K. A Tabela 7 mostra as características químicas do solo da área experimental antes da implantação do experimento.

Tabela 7. Características químicas do solo da área experimental. (Campo Experimental – Embrapa Agrobiologia).

Prof cm	Al	Ca	H+Al	Mg	N	K	P	pH
cmolc.dm ³				%mg.dm ³		unid
0 - 30	0	0,89	2,46	0,52	0,05	57,96	11,48	5,65

5.2.3.2 Estirpes utilizadas

As estirpes de bactérias endofíticas diazotróficas testadas nesse experimento (Tabela 8) foram pré-selecionadas a partir dos resultados do experimento anterior conduzido em vasos. A estirpe P5-2 (*Rhizobium*) foi incluída por mostrar efeito promotor de crescimento em cana-de-açúcar sob condição de casa de vegetação em trabalho anterior (FERREIRA et al., 2020; MATOS, 2017). Os inoculantes foram preparados como descrito para o experimento em casa de vegetação.

Tabela 8. Estirpes que apresentaram efeito promotor de crescimento em cana-de-açúcar em experimento de casa de vegetação.

Estirpes selecionadas	Gênero	Origem isolamento
P5-2	<i>Rhizobium</i>	Cana-de-açúcar
P9-20	<i>Bradyrhizobium sacchari</i>	Cana-de-açúcar
P7-6	<i>Bradyrhizobium</i>	Cana-de-açúcar
AG48	<i>Bradyrhizobium</i>	Cana-de-açúcar
RBR134b	<i>Bradyrhizobium</i>	Cana-de-açúcar

No experimento de casa de vegetação o tratamento controle de inoculação utilizado foi o inoculante cinco estirpes da Embrapa. Entretanto, um novo inoculante comercial contendo *Nitrospirillum amazonense* BR11145 foi lançado em 2018, após o primeiro experimento. O inoculante foi desenvolvido pela multinacional alemã BASF em parceria com a Embrapa e registrado comercialmente como Aprinza (EMBRAPA, 2018). Por esse motivo, o controle inoculado do experimento de campo foi com esta referida estirpe. Além do controle inoculado com *N. amazonense* BR11145, também foram preparados tratamentos controle não inoculado com baixa dose de N (40kg/ha = N40) e não inoculado com alta dose de N (80kg/ha = N80). A dose de 40kg de N/ha foi fornecida para todos os tratamentos inoculados. Os tratamentos descritos a seguir compuseram o desenho experimental:

- 1- Não inoculado N40;
- 2- Não inoculado N80;
- 3- Inoculação com *Nitrospirillum amazonense* (BR11145);
- 4- Inoculação com a estirpe P5-2;
- 5- Inoculação com a estirpe P9-20;
- 6- Inoculação com a estirpe P7-6;
- 7- Inoculação com a estirpe AG48;
- 8- Inoculado com a estirpe RBR134b.

5.2.3.3 Germinação de minitoletes e produção de mudas

Após a inoculação (descrita no tópico 5.2.1.2), os minitoletes foram transferidos para bandejas contendo 13 kg de substrato esterilizado, composto pela mistura de areia com vermiculita (2:1 v/v). Para cada tratamento foram utilizadas 10 bandejas contendo 25 minitoletes cada, totalizando 250 minitoletes para cada tratamento. As bandejas foram organizadas em blocos ao acaso em casa de vegetação e irrigadas com água filtrada de acordo com a necessidade das plantas, sempre aplicando o mesmo volume de água para todas as bandejas. O crescimento e brotamento dos minitoletes foi acompanhado diariamente até o transplântio para tubetes. Tubetes de 180 cm³ (diâmetro 63 mm, altura 135 mm) com substrato Multiplant™ (Buschle e Lepper SA, Joinville, Santa Catarina, Brasil) foram preparados e a transferência foi realizada 23 dias após início do brotamento nas bandejas. As mudas de cada tratamento foram selecionadas para transplântio de forma padronizada quanto ao seu comprimento da parte aérea.

5.2.3.4 Preparo da área experimental e plantio

O transplântio das mudas desenvolvidas para o campo ocorreu 15 dias após sua transferência para os tubetes. Para o preparo da área experimental foram realizadas aração, gradagem e incorporação de corretivos de solo de acordo com o resultado da análise de solo,

que foi realizada na profundidade de 0-30 cm, e da exigência nutricional da cultura. Foi realizada adubação no plantio e de cobertura com 100 kg de potássio (cloreto de potássio), 100 kg de fósforo (super simples), 40 kg de nitrogênio (ureia) e com 40 kg de micronutrientes (FTE BR12). O tratamento com alta dose de N recebeu 80 kg de N por hectare. A adubação foi parcelada, com aplicação de 50% do NPK (nitrogênio, fosforo e potássio) no fundo do sulco no momento do plantio e 50% 43 dias após plantio, sendo os micronutrientes aplicados em dose única no momento do plantio. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 8 tratamentos e 5 repetições, totalizando 40 parcelas. A variedade de cana utilizada foi a RB867515. As parcelas constituíram de 4 linhas de 2,0 m, cada uma com 5 plantas espaçadas em 0,5 m cada com espaçamento de 1,5 metros entre linhas, totalizando 9 m² por parcela e 730 m² de área experimental total, incluindo os espaços entre parcelas (2 m) e blocos (2 m).

O acompanhamento do desenvolvimento inicial das plantas no campo se deu com avaliação aos 45 e 85 dias após o plantio no campo. Aos 45 DAT foi avaliado comprimento da parte aérea, área foliar, número de brotos e diâmetro do colmo. Aos 85 DAT foi avaliado o comprimento e área foliar. A área foliar foi determinada como descrito no item 5.2.2.3. O corte da cana planta foi realizado 12 meses após plantio das mudas no campo. Entretanto a produtividade não foi avaliada devido a entrada de animais na área experimental poucos meses antes do corte.

5.2.3.5 Adubação e inoculação de soqueira

No dia seguinte ao primeiro corte da cana planta, que ocorreu 12 meses após o transplantio das mudas para o campo, as plantas dos tratamentos inoculados receberam outra dose de inoculante (reinoculação), de acordo com os tratamentos iniciais. Para o preparo do inóculo, 100 mL de cultura foram diluídos em 10 L de água filtrada e desclorada. Foi aplicado, com jato dirigido na superfície do corte com o auxílio de um aplicador costal, o equivalente a 200 mL por metro linear de sulco. Sessenta dias após o corte, realizou-se uma nova adubação com aplicação de 40 kg de N/ha em uma única dose em todos os tratamentos, exceto para as plantas do tratamento N80, que receberam o equivalente a 80 kg de N/ha. A adubação com fósforo e potássio foi igual para todos os tratamentos, com aplicação em dose única do equivalente a 100 kg/ha de cada um destes nutrientes.

5.2.3.6 Colheita, avaliações agronômicas, preparo e análises de amostras

Na colheita, as linhas externas (bordadura) de todas as parcelas foram cortadas e descartadas para facilitar a colheita da área útil, composta pelas 6 plantas centrais. As avaliações foram realizadas nas linhas úteis de cada parcela com determinação do número total e peso de colmo, massa de folhas verdes e palha nas linhas úteis de cada parcela. Além disso, de cada planta da área útil foi coletada amostra da folha +3 para análise nutricional. Para as análises, foram utilizados quatro colmos selecionados aleatoriamente de cada parcela. Após a determinação do peso fresco de cada fração, foram retiradas subamostras para serem secas em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C até atingirem peso constante. Com base nos pesos frescos determinados no campo e do percentual de matéria seca das subamostras foram estimadas a produtividades dos colmos frescos e a massa de matéria seca total da parte aérea por hectare. Além disso, amostras de caldo coletadas de subamostras de cada parcela foram utilizadas para medição da porcentagem de sólidos solúveis (Brix) com refratômetro de campo. Amostras de folha +3 após secagem foram pesadas e moídas em moinho de facas tipo Wiley (2 mm) e em seguida determinada a concentração de macronutrientes e N total pelo método Semi-micro Kjeldahl (NOGUEIRA et al., 1998).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Seleção de Estirpes de Rizóbios para Cana-de-Açúcar em Casa de Vegetação

No transplante das mudas para os vasos com solo, os tratamentos inoculados com o Mix, M12 ou P10-5 apresentaram as maiores médias no comprimento da parte aérea (Figura 11). Já aos 30 dias após o transplante não foi observada diferença estatística entre os tratamentos (Figura 11). Em relação ao diâmetro do colmo, aos 30 DAT os tratamentos inoculados com AG48, Mix, IAE20b, IAR216a, M12, P10-5, P7-6 ou RBR134b não diferiram estatisticamente do controle N80, que apresentou a maior média (Tabela 9).

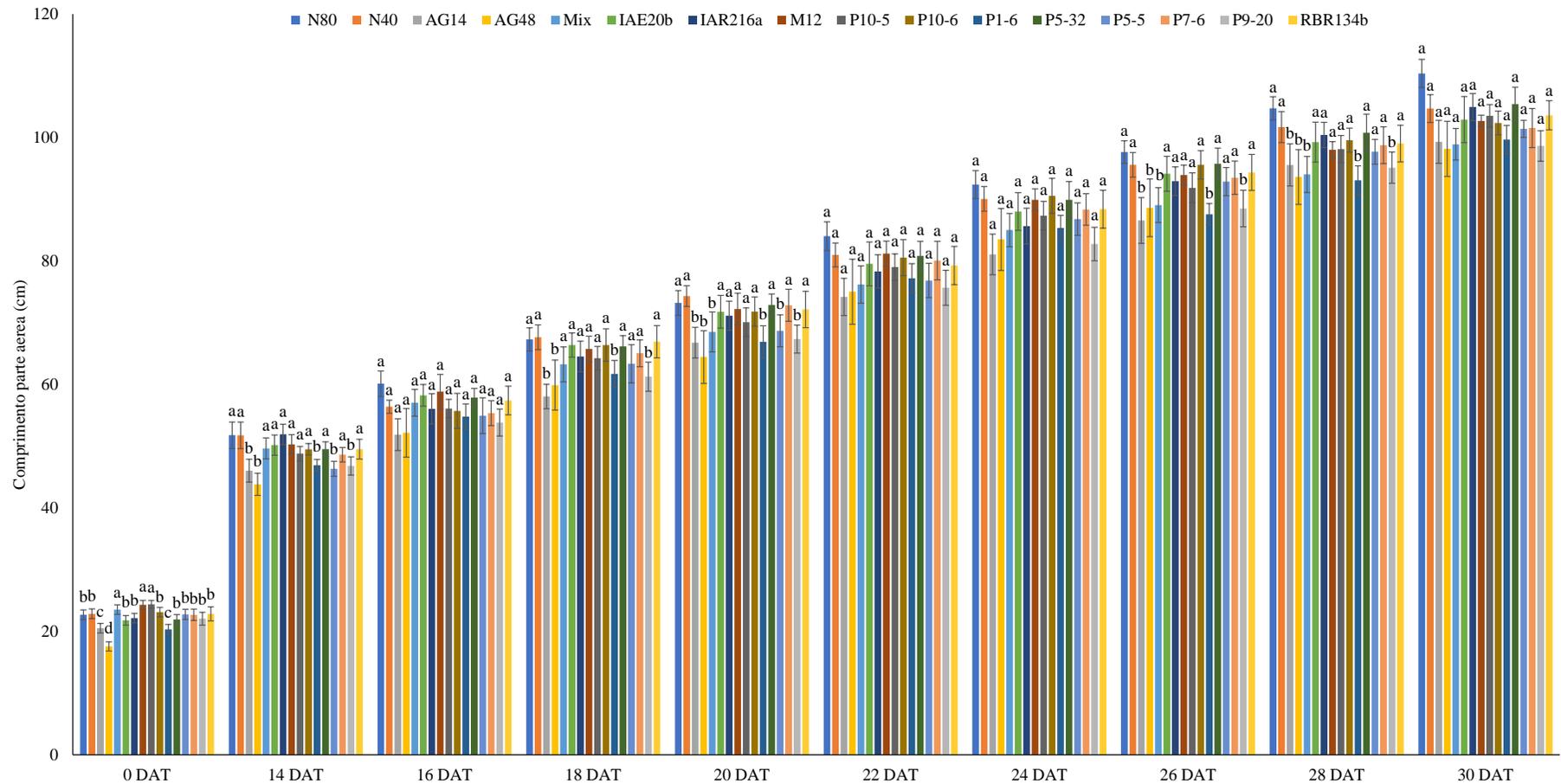


Figura 11. Comprimento de parte aérea de plantas de cana-de-açúcar cv. RB867515 inoculadas ou não (tratamentos N80 e N40) transplantadas para vasos com solo sob condições de casa de vegetação. No 0DAT (dias após transplantio) equivale ao comprimento das mudas no dia do transplantio para os vasos (28 dias após a inoculação). Todos os tratamentos tiveram 8 repetições em bloco ao acaso. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Scott knot, $p < 0,05$) entre as médias de tratamento, para cada ponto de tempo. DAT – dias após transplantio.

Aos 30 dias, o acúmulo da massa fresca da parte aérea mostrou maior média para o tratamento N80, seguido do tratamento inoculado com RBR216a. Não houve diferença significativa da massa seca da parte aérea (Tabela 9). Em relação a área foliar, os tratamentos inoculados com RBR134b, P9-20, P5-5 ou P5-32 diferiram significativamente dos demais tratamentos, inclusive dos controles com baixo ou alto N (Tabela 9). Vale ressaltar, que o tratamento com baixa dose de N apresentou a menor média de área foliar e o inoculado com RBR134b a maior, com incremento de 36,6% sobre o valor observado para o controle N40.

Tabela 9. Variáveis analisadas de cana-de-açúcar cv. RB867515 inoculada, em casa de vegetação, aos 30 dias após o transplântio para vasos com solo. (AF) área foliar. (DC) diâmetro do colmo. (CFL) clorofila. (MPAF) massa parte aérea fresca. (MPAS) massa parte aérea seca. (MRS) massa de raiz seca. (MSF) massa fresca de raiz. (VL) volume de raiz.

Tratamento	AF	SK	DC	SK	CFL	LSD	MPPA	SK	MSPA	SK	MSR	LSD	MFR	SK	VR	LSD
cm ²mm....mm....mm....IFC....(grama).....					mL....			
N80	155,5	b	6,7	a	48,7	a	21,1	a	4,4	a	1,2	bc	8,2	a	8,8	b
N40	141,0	b	6,4	a	41,5	b	19,1	a	4,3	a	1,2	bc	8,0	a	8,6	b
AG14	154,3	b	6,0	b	47,6	a	17,2	a	3,9	a	1,2	bc	8,5	a	9,4	ab
AG48	169,2	b	6,4	a	49,6	a	19,5	a	4,1	a	1,5	abc	7,6	a	10,1	ab
Mix	159,7	b	6,5	a	46,3	ab	18,1	a	4,0	a	1,0	c	7,4	a	8,4	b
IAE20b	164,3	b	6,4	a	47,1	ab	18,8	a	3,9	a	1,3	abc	9,1	a	9,8	ab
IAR216a	165,4	b	6,4	a	45,7	ab	20,0	a	4,1	a	1,0	c	7,8	a	8,4	b
M12	173,1	b	6,5	a	47,4	a	19,3	a	4,3	a	1,5	abc	9,9	a	9,6	ab
P10-5	159,0	b	6,5	a	44,6	ab	19,1	a	4,3	a	1,5	abc	9,0	a	9,4	ab
P10-6	181,4	a	6,4	a	44,0	ab	19,2	a	4,4	a	1,8	ab	9,5	a	9,5	ab
P1-6	144,7	b	6,0	b	46,6	ab	17,1	a	3,8	a	1,5	abc	7,9	a	8,5	b
P5-32	182,6	a	6,2	b	46,9	ab	18,8	a	4,1	a	1,2	abc	9,3	a	9,2	ab
P5-5	193,1	a	6,1	b	47,6	a	18,4	a	4,0	a	1,4	abc	9,0	a	9,5	ab
P7-6	150,9	b	6,4	a	45,3	ab	19,0	a	4,3	a	1,9	a	10,6	a	10,9	a
P9-20	187,1	a	6,2	b	47,3	a	17,8	a	4,0	a	1,2	abc	8,4	a	9,2	ab
RBR134b	222,5	a	6,3	a	46,0	ab	19,2	a	4,2	a	1,2	bc	9,0	a	10,1	ab
CV (%)	24,6		6,2		12,3		10,7		11,2		53,3		23,5		18,9	

-Médias seguidas de letras distintas, para cada variável, diferem entre si ($p < 0,05$) no teste t (LSD) e Scott-Knott (SK).

O desenvolvimento das folhas se correlaciona com as taxas de crescimento e acúmulo de massa das plantas, uma vez que é nelas que ocorre a interceptação da radiação solar e conversão em energia química pela fotossíntese (CLIFTON-BROWN; JONES, 1997; JIAO et al., 2016; NIINEMETS, 1998). As médias de área foliar dos controles com alta ou baixa dose de N não diferiram entre si e foram menores do que de alguns dos tratamentos inoculados (Tabela 9), o que indica que o N não influenciou nessa característica até os 30 DAT nas condições experimentais utilizadas.

Os tratamentos inoculados com P9-20, P5-5, M12, AG48 ou AG14 diferiram significativamente do tratamento não inoculado (N40) em relação ao teor de clorofila, sendo equivalentes ao tratamento com alta dose de N (N80) (Tabela 9). Vale ressaltar, que o tratamento inoculado com AG48 apresentou incremento de 16,3% em relação ao tratamento controle com baixo N. Diante disso, o teor de N foi determinado para as plantas inoculadas com AG48 e o controle N40. Embora não tenha ocorrido diferença estatística, o teor de N das plantas

inoculadas com AG48 apresentou incremento médio de 8,8% em relação ao controle N40 (Figura 12).

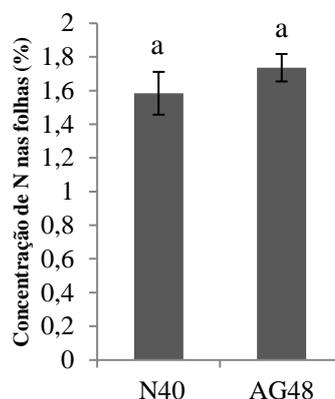


Figura 12. Teor de nitrogênio nas folhas de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 30 DAT em experimento de casa de vegetação em vasos com solo. Teste de média Scott Knot a 5%.

O tratamento com maior dose de N diferiu significativamente no índice de clorofila em suas folhas em relação aos das plantas que receberam menor dose, o que indica que aos 30 DAT as plantas já estavam se beneficiando do N do solo. Peng et al. (2002) observaram que estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* podem promover o crescimento e a produtividade de arroz por meio de mecanismos que melhoram a taxa fotossintética líquida de folhas, mesmo que não ocorra contribuição significativa da FBN. Em arroz inoculado com a estirpe SUTN9 de *Bradyrhizobium* o aumento na clorofila foi relacionado com a capacidade promotora de crescimento dessa estirpe. Além disso, esse efeito foi maior na fase inicial de crescimento (GREETATORN et al., 2019). Chauhan et al. (2013) observaram efeito da inoculação com *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Bacillus* ou *Pseudomonas* no teor de clorofila de cana-de-açúcar em campo aos 90 dias após o plantio ao comparar com controle não inoculado.

Ao avaliar o sistema radicular das plantas, foi possível observar que o volume e a massa seca do sistema radicular apresentaram valores médios com comportamento semelhantes, onde o tratamento inoculado com a estirpe P7-6 apresentou as maiores médias (Tabela 9). Observou-se diferenças significativas em relação ao tratamento N40, com incrementos de 21,1 e 36,8% para o volume de raiz e massa da raiz seca, respectivamente. Plantas com sistema radicular melhor desenvolvido possuem vantagem para suportar o estresse hídrico no campo e até mesmo aproveitar melhor os nutrientes do solo, além de permitir o estabelecimento mais rápido de mudas após plantio (DAVIS & JACOBS, 2005; INMAN-BAMBER et al., 2012; SMITH et al., 2005).

O fato de terem sido observadas diferenças significativas da inoculação na massa seca e volume de raiz com a inoculação da estirpe P7-6, pode indicar que os efeitos tenham sido causados por ação de fitohormônios, como auxinas, que promovem o desenvolvimento das raízes (FERREIRA et al., 2020). Possivelmente, o curto período de duração do ensaio (30 DAT) não tenha sido suficiente para refletir diferenças no desenvolvimento da parte aérea, uma vez que nem o tratamento com alta dose de N chegou a diferir significativamente em massa seca ou fresca da parte aérea aos 30 DAT. De modo semelhante, Dos Santos et al. (2019) observaram que, independentemente da inoculação, o desenvolvimento inicial de minitoletes de cana-de-açúcar cv. RB867515 foi canalizado para o sistema radicular e não para os brotos, não havendo diferença significativa em parâmetros como diâmetro do colmo, número de folha ou comprimento da parte aérea aos 30 DAT.

Durante a brotação da cana-de-açúcar, as plantas dependem das reservas presentes nos toletes, à medida que o sistema radicular se desenvolve e a área de absorção de água e nutrientes

aumenta, essa dependência vai diminuindo (MARAFON, 2012). Tendo em vista a curta duração do experimento (30 dias), isso poderia explicar a ausência de diferenças significativa entre as plantas sob os tratamentos N80 e N40 nas variáveis analisadas, com exceção do teor de clorofila nas folhas (Tabela 9). Entretanto, a eficiência do uso dessa reserva pode variar dependendo do desenvolvimento da parte aérea e raízes das plantas. Nesse sentido, a inoculação com bactérias promotoras de crescimento pode influenciar nesse processo por meio da produção de fitohormônios. Ao analisar o tecido de minitoletes que restaram após a brotação de mudas inoculadas com a estirpe *Rhizobium* sp. P5-2, aos 75 DAT, o mesmo apresentou a menor conteúdo de N em comparação com o controle não inoculado, mas também apresentou maior superfície específica do sistema radicular, massa seca e volume de raiz, além de aumento na velocidade de brotamento das plantas. (MATOS, 2017; Ferreira et al. 2020). Isso indica que o crescimento maior causado pela inoculação permitiu o maior aproveitamento das reservas de N disponível nos minitoletes para seu desenvolvimento inicial. De fato, revelou-se que a estirpe P5-2 afeta o crescimento vegetal por meio da produção de substâncias hormonais, embora seja incapaz de fixar nitrogênio (FERREIRA et al., 2020). Boiero et al. (2007) mostraram por métodos quantitativos que estirpes do gênero *Bradyrhizobium* podem ser capazes de produzir ácido indol-3-acético (IAA), ácido giberélico (GA₃), ácido abscísico (ABA), etileno e zeatina, e que mesmo dentro da mesma espécie as estirpes possuem diferenças quanto a quantidade e o número de fitohormônios que são capazes de produzir. Variações na capacidade de biossíntese de fitormônios pelas estirpes estudadas pode ser uma explicação para os efeitos da inoculação das diferentes estirpes estudadas nesse ensaio, mas essa possibilidade necessita de estudos adicionais.

Por se tratar de uma prática recente, poucos estudos foram realizados avaliando a produção de mudas pré-brotadas associada com a inoculação de bactérias promotoras de crescimento. Portanto, há necessidade de compreensão da interação de bactérias promotoras de crescimento com as mudas, uma vez que o ambiente pós inoculação é completamente diferente no que ocorre no sistema convencional, com inoculação no campo no momento do plantio

No ensaio de casa de vegetação, avaliando efeito da inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em minitoletes de cana-de-açúcar em casa de vegetação, permitiu selecionar as estirpes RBR134b, AG48 e P7-6, que foram capazes de aumentar a área foliar, teor de clorofila e sistema radicular, respectivamente, das plantas avaliadas 30 DAT (Tabela 9), sendo selecionadas para experimentos adicionais a nível de campo.

5.3.2 Experimento de Campo

5.3.2.1 Fase de mudas

A emergência dos minitoletes iniciou-se com oito dias após o plantio (DAP) sem diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, entre 10 e 15 DAP foi observado um aumento na taxa de brotamento nos tratamentos inoculados com AG48, P5-2, P9-20 e RBR134b (Figura 13). A partir dos 16 DAP não foram mais observadas diferenças significativas entre os tratamentos, havendo estabilização no brotamento aos 18 DAP.

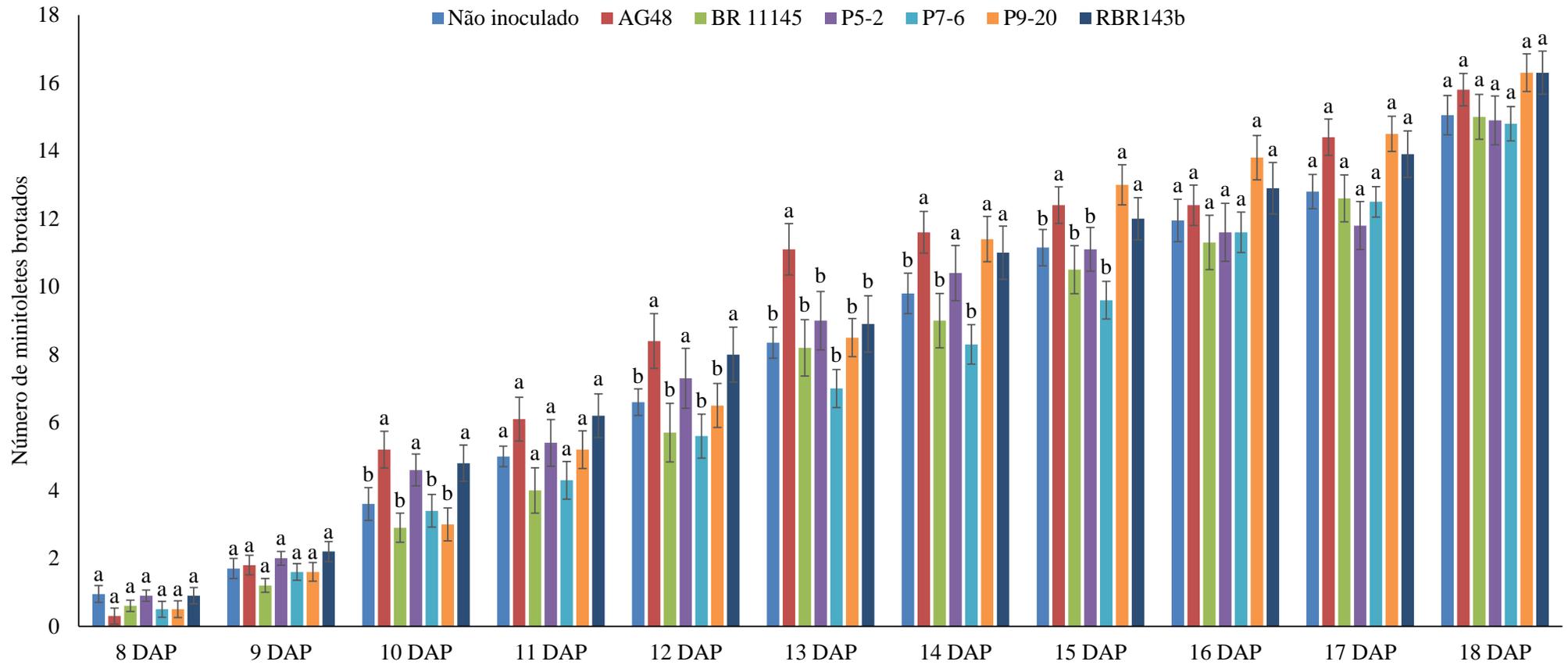


Figura 13. Brotamento de minitubetes de cana-de-açúcar cv. RB867515 inoculados ou não e plantados em substrato composto de mistura de areia e vermiculita (2:1). Todos os tratamentos tiveram 10 repetições em bloco ao acaso. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Scott Knot, $p < 0,1$) entre as médias dos tratamentos, para cada tempo de avaliação. DAP – dias após plantio.

5.3.2.2 Fase de campo

Aos 45 DAT das mudas para o campo, todos os tratamentos inoculados apresentavam maior média do comprimento da parte aérea em relação ao tratamento não inoculado N40, mas inferior ao tratamento N80, embora as diferenças não foram estatisticamente significativas. Apenas os tratamentos N40 e N80 diferiram significativamente (LSD, $p < 0.05$). Esse comportamento foi mantido até os 85 DAT, data da última avaliação (Figura 14).

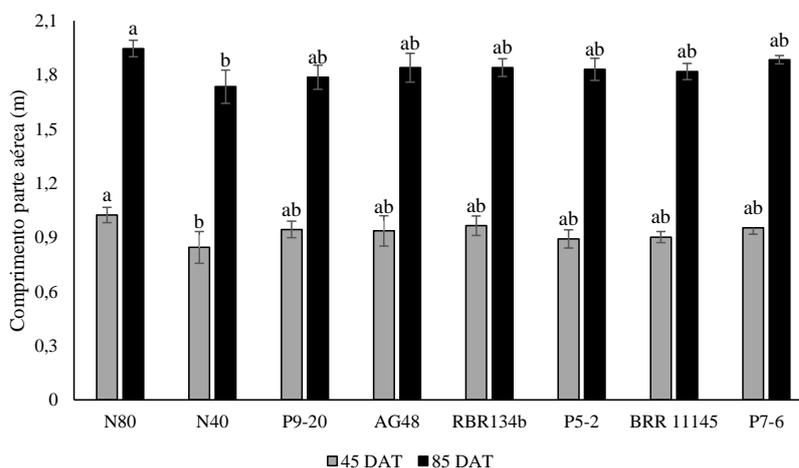


Figura 14. Comprimento da parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 45 e 85 dias após o transplante (DAT) de mudas inoculadas ou não (tratamentos N40 e N80) para o campo. Cada tratamento consistiu de cinco repetições. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indica diferença significativa (LSD, $p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos.

Em relação a área foliar, aos 45 DAT não foi observado diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, a menor média observada foi no tratamento sem inoculação e com baixo nível de N (N40). Aos 85 DAT a área foliar do tratamento inoculado com P7-6 estava equivalente ao controle N80 e superior ao tratamento N40, com incremento de 19,5% em relação a este último (Figura 15). A cana-de-açúcar é uma cultura que possui desenvolvimento inicial lento do seu dossel quando comparada com outras culturas anuais. Isso pode ser um fator crítico para limitar o rendimento final da cultura (INMAM-BAMBER, 1991; INMAN-BAMBER, 1994). Considerando plantas em condição de campo, a maior área foliar também pode ser importante no controle das plantas invasoras, pois o sombreamento retarda seu crescimento, diminuindo a competição por nutrientes e água com a cana-de-açúcar (GIBSON et al., 2001). Sinclair et al. (2004) estudando os fatores que afetam a área foliar de cana-de-açúcar, observaram que a principal variante são as folhas individuais no início do ciclo de desenvolvimento, que tendem a ter maior área. Esses autores sugeriram o uso de genótipos que possuem folhas com grande área no início do ciclo de desenvolvimento para futuros esforços de melhoramento, por se tratar de uma característica que contribui para uma alta produtividade de cana-de-açúcar. Portanto, a obtenção de uma estirpe promotora de crescimento com a capacidade de aumentar a área foliar em condições de campo pode ter grande importância biotecnológica.

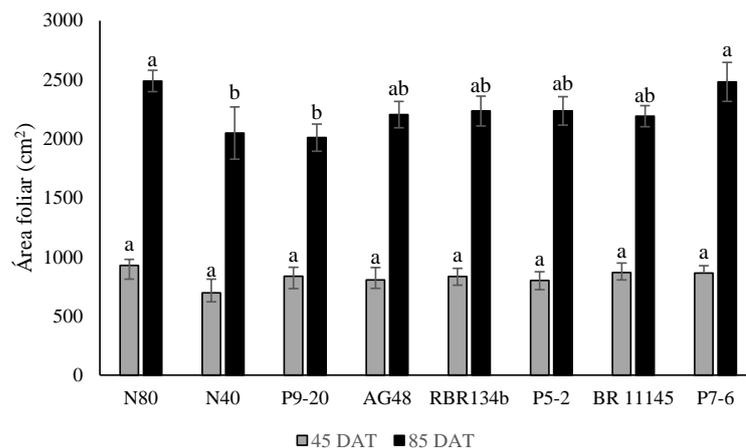


Figura 15. Área foliar de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 45 e 85 dias após o transplante (DAT) de mudas inoculadas ou não (tratamentos N40 e N80) para o campo. Cada tratamento consistiu de cinco repetições. O erro padrão é representado por barras de erro. Letras diferentes indica diferença significativa (LSD, $p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos.

Devido a um grande dano causado pela entrada de animais na área experimental três meses antes da coleta de cana planta (2018-2019), foram levados em consideração apenas os dados coletados nos primeiros meses da cana planta e os coletados no segundo corte (primeira soqueira) (2019-2020) para fins comparativos.

Avaliação primeira soqueira

Embora os tratamentos inoculados com AG48, P9-20, P7-6 ou P5-2 tenham apresentado produção de colmo equivalentes aos tratamentos não inoculados com alta (N80) e baixa (N40) dose de N, os tratamentos N80 e inoculado com P9-20 apresentaram incrementos de 7,41% e 4,83%, respectivamente, em relação ao tratamento N40. Já, o tratamento inoculado com *Nitrospirillum amazonense* BR11145 apresentou incremento de 10,37% na produção de colmo, em relação ao tratamento N40 (Tabela 10), o que confirma estudos anteriores sobre a eficiência dessa bactéria na promoção de crescimento de cana-de-açúcar (REIS et al., 2020). A menor média de produção de colmo observada foi para o tratamento inoculado com RBR134b (Tabela 10). Ao ser avaliado o grau brix de amostras do caldo, o tratamento inoculado com BR11145 foi equivalente ao tratamento não inoculado N80 e superior aos demais tratamentos (Tabela 10). Em relação a massa seca total da parte aérea (MSPA), os tratamentos controles com alta e baixa dose de N não diferiram entre si estatisticamente, e foram equivalentes aos tratamentos inoculados com AG48, P5-2 e P9-20. Esse comportamento foi similar ao observado para a produção de colmo (Tabela 10).

Schultz et al. (2014) observaram que, com o aumento do número de socas da cana-de-açúcar, a inoculação perdia sua eficiência. Isso está de acordo com o incremento de produção de colmo de alguns tratamentos inoculados em relação ao controle N40, mas não houve diferenças significativas no presente estudo (Tabela 10). Devido à falta dos dados de produção da cana planta (primeiro corte) no presente estudo, não foi possível a comparação entre os dados da cana planta e primeira soqueira. Entretanto, nos primeiros meses da cana planta puderam ser observados benefícios da inoculação no comprimento da parte aérea e área foliar (Figura 14; Figura 15). A inoculação com bactérias endofíticas diazotróficas de cana-de-açúcar tem mostrado resultados de produção de colmo equivalente a aplicação de altas dose de nitrogênio e até aumentos no rendimento total de açúcar recuperável (SCHULTZ et al., 2012, 2014, 2017). Entretanto, a inoculação não tem afetado a fixação biológica de nitrogênio (SCHULTZ et al.,

2014, 2017; PEREIRA et al., 2020), mesmo com estimativas indicando que a contribuição da FBN para o N da cana-de-açúcar seja de até 60% (URQUIAGA et al., 1992; URQUIAGA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2019a). A cana-de-açúcar possui grande diversidade de microrganismos associados (DE SOUZA et al., 2016) e muitos podem estar de fato contribuindo naturalmente com FBN, inclusive rizóbios (FISCHER et al., 2012). Pereira et al. (2020) observaram contribuição de mais de 30% do N na cultivar RB92579 de cana-de-açúcar pela FBN, mas que não teve origem da inoculação.

Tabela 10. Dados de produção parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515, inoculada ou não, primeira soqueira. Grau Brix, Produção do Colmo (PC) e Massa Seca da Parte Aérea (colmo, folha e palha – MSPA).

Tratamento	Brix	LSD	PC	LSD	MSPA	LSD
%.....	Mg ha ⁻¹			
N80	20	a	147,5	ab	56,4	ab
N40	19,9	ab	136,5	ab	57,3	ab
AG48	19,9	ab	138,9	ab	56,4	ab
BR11145	20,2	a	152,3	a	61,8	a
P5-2	19,1	ab	120,2	ab	49,8	ab
P7-6	19,1	ab	122,9	ab	48,0	b
P9-20	19,7	ab	143,5	ab	58,2	ab
RBR134b	18,7	b	115,5	b	47,0	b
C.V.%	5,53		20,53		20,47	

- Médias seguidas de letras distintas, para cada variável, diferem entre si no teste t (LSD) ou Scott- Knott (SK), em $p < 0,10$ ou $p < 0,05$. **Grau brix** ($p < 0,05$), **PC** ($p < 0,05$) e **MSPA** ($p < 0,10$).

Análise química de folhas da primeira soqueira

Análise química de amostras seca da folha +3 mostrou que os tratamentos não diferiram em concentração de N, Ca e Mg. O tratamento inoculado com P5-2 mostrou maiores concentrações em Ca e P em relação aos demais tratamentos, mas sem apresentar diferença estatística em relação aos controles com mais (N80) ou menos N (N40). Em relação ao K, o tratamento inoculado com P9-20 mostrou a maior concentração média, diferindo significativamente do tratamento não inoculado N80, que apresentou a menor concentração (Tabela 11).

Comparando a capacidade de remobilização dos nutrientes em plantas, o N é o mais móvel, seguido de P e K, enquanto que o Ca apresenta baixa remobilização (MAILLARD et al., 2015; MARTINS et al., 2016; WHITE, 2011). No caso da cana-de-açúcar, que é uma cultura de grande capacidade produtiva e que acumula alto teor de sacarose, há uma alta demanda por nutrientes (MARTINS et al., 2016). Não haver diferença no teor de nitrogênio nas folhas no final do ciclo é esperado, uma vez que os cloroplastos são degradados para remobilização de nutrientes para produção de açúcar, o que resulta, na cana-de-açúcar, em diminuição de pigmentos fotossintéticos (MARTINS et al., 2016). A dinâmica do potássio, segundo ZHANG et al. (2010), é bastante móvel, e sua absorção depende, em grande parte, do suprimento de N do solo. Dessa forma, a taxa de aplicação de nitrogênio, o tempo de aplicação e a forma de N fornecido podem influenciar na fixação e liberação de K no solo, bem como na absorção, transporte, ciclagem e reutilização de K nas lavouras (SIMONSSON et al., 2007; ZHANG et al., 2010). Logo, pode-se relacionar a maior dose de N aplicada no tratamento N80 à concentração diferente de K nas folhas das plantas desse tratamento, uma vez que os demais

tratamentos receberam apenas metade da quantidade de N aplicada nas plantas do tratamento N80 e apresentaram concentração de K nas folhas equivalente entre si (Tabela 11).

Tabela 11. Concentração de nutrientes baseada em análise química da folha +3 da primeira soqueira de cana-de-açúcar cv. RB867515, inoculada ou não, cultivada na área experimental da Embrapa Agrobiologia. Médias seguidas de letras distintas, para cada variável, diferem entre si no teste t (LSD) em $p < 0,05$. EP \pm - valor de erro padrão de cada média.

Tratamento	N		K		Mg		P		Ca		
% g/Kg								
N80	0,95	0,03	4,22 b	0,08	2,40	0,18	0,86 ab	0,07	5,70	0,41	
N40	0,99	0,04	5,11 ab	0,26	2,47	0,13	0,93 ab	0,02	4,91	1,02	
AG48	0,95	0,04	4,71 ab	0,45	2,35	0,10	0,88 ab	0,07	5,56	0,28	
BR11145	0,97	0,02	5,07 ab	0,38	2,32	0,20	0,92 ab	0,05	5,18	0,24	
P5-2	1,00	0,02	4,69 ab	0,22	2,40	0,13	1,00 a	0,04	6,08	0,49	
P7-6	0,90	0,11	5,17 ab	0,59	2,29	0,27	0,83 ab	0,10	5,36	0,54	
P9-20	0,99	0,03	5,56 a	0,72	2,33	0,18	0,96 ab	0,08	5,76	0,20	
RBR134b	0,95	0,02	4,82 ab	0,76	2,40	0,10	0,81 b	0,07	5,48	0,26	
C.V. (%)	10,5		20,57		17,78		15,1		19,0		

Os dados de produção no presente estudo confirmam a estirpe BR1115 como eficiente na promoção de crescimento de cana-de-açúcar (REIS et al., 2020). Vale ressaltar, que essa estirpe já foi muito estudada em campo com aplicação em diversos tipo de solo e cultivares para comprovação de seu potencial de promoção de crescimento de cana-de-açúcar, sendo inoculada individualmente ou em mistura com outras estirpes, o que culminou no desenvolvimento de um inoculante denominado Aprinza, que faz parte do pacote tecnológico Muneo[®] BioKit da BASF. Entretanto, este é o primeiro estudo de aplicação de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* em cana-de-açúcar a nível de campo, portanto é uma linha com muitas possibilidades de exploração a fim de se alcançar melhores resultados.

5.4 CONCLUSÕES

Diferentes estirpes do gênero *Bradyrhizobium* possuem efeitos benéficos sobre diferentes características de crescimento de cana-de-açúcar afetando o sistema radicular, teor de clorofila e área foliar;

Bradyrhizobium sp. P7-6 possui potencial para acelerar desenvolvimento foliar em cana-de-açúcar cv. RB867515 em campo na cana planta. Para esclarecer o efeito da inoculação na produção de colmo de cana planta, experimentos adicionais são necessários.

6 CAPITULO IV

O HISTÓRICO RECENTE DE CULTIVO DO SOLO AFETA A COMPOSIÇÃO MICROBIANA DA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

6.1 RESUMO

Plantas da família das leguminosas são muito utilizadas na prática de rotação de cultura. O principal motivo do uso dessa família é sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico através de simbiose com bactérias que podem beneficiar a próxima cultura em termos de matéria seca ou N disponível. Essa prática vem sendo muito utilizada nas áreas de canaviais do Brasil. Os relatos de isolamento de rizóbios de raízes de cana-de-açúcar, que são capazes de nodular eficientemente espécies de leguminosas, indica a possibilidade de a cana-de-açúcar aproveitar a FBN não apenas de forma indireta dessas culturas. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo compreender como a rotação de cultura no sistema de cultivo de cana-de-açúcar pode alterar a abundância de microrganismos promotores de crescimento associados às suas raízes. Para isso, solo de área de canavial foi utilizado para realização de experimento em vasos em delineamento experimental em blocos casualizados. O experimento aconteceu em duas etapas. (Etapa 1) - Inicialmente foram cultivadas as culturas da soja, amendoim e braquiária ou deixado sem cultivo (pousio) por um período de 120 dias. Após essa fase, as plantas foram trituradas e deixadas nos vasos por 30 dias. Amostra do solo foram coletadas antes do plantio e após os 30 dias que as plantas foram trituradas; (Etapa 2) - Cana-de-açúcar foi plantada em todos os vasos e teve seu crescimento acompanhado. Trinta dias após o plantio a massa da parte aérea seca das plantas foi determinada. Amostras de solo e da rizosfera de cana-de-açúcar foram coletadas. Análise de fertilidade química do solo foi determinada ao final das duas etapas do experimento. A mudança no microbioma rizosférico de cana-de-açúcar após rotação de cultura com o cultivo de soja, amendoim, braquiária ou pousio (sem cultivo) foi observada através da extração do DNA das amostras do solo total (etapa 1) e rizosfera de cana-de-açúcar (etapa 2) e sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA usando Illumina MiSeq. Os resultados não mostraram diferenças significativas na fertilidade do solo, comprimento da parte aérea e massa da parte aérea seca entre as plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solo que esteve em pousio ou em rotação de cultura. Entretanto, o cultivo prévio de culturas, aumentou a abundância de rizóbios e de outros gêneros de bactérias promotoras de crescimento na rizosfera de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, cana-de-açúcar, promoção de crescimento.

6.2 ABSTRACT

Plants from the legume family are widely used in crop rotation. The main reason for using this family is its ability to fix atmospheric nitrogen through symbiosis with bacteria that can benefit the next crop in terms of dry matter or available N. This practice has been widely used in sugarcane fields in Brazil. Reports of isolation of rhizobia from sugarcane roots, which are able to efficiently nodulate legume species, indicate the possibility that sugarcane can take advantage of BNF not only indirectly from these crops. In this sense, the present work aimed to understand how crop rotation in the sugarcane cultivation system can change the abundance of growth-promoting microorganisms associated with its roots. For this, soil from a cane field was used to carry out an experiment in pots in a randomized block design. The experiment took place in two steps. (Step 1) Initially, soybean, peanut and brachiaria cultures were cultivated or left uncultivated (fallow) for a period of 120 days. After this phase, the plants were crushed and left in pots for 30 days. Soil samples were collected before planting and after 30 days that the plants were crushed; (Step 2) Sugarcane was planted in all pots and its growth was monitored. Thirty days after planting, the aerial dry mass of the plants was determined. Soil and rhizosphere samples of sugarcane were collected. Soil chemical fertility analysis was determined at the end of the two stages of the experiment. The change in the sugarcane rhizospheric microbiome after crop rotation with soybean, peanut, brachiaria or fallow (no cultivation) was observed by extracting DNA from total soil samples (step 1) and sugarcane rhizosphere (step 2) and sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene using Illumina MiSeq. The results did not show significant differences in soil fertility, shoot length and shoot dry mass between sugarcane plants grown in fallow or crop rotation soil. However, prior cultivation of crops increased the abundance of rhizobia and other genera of growth-promoting bacteria in the sugarcane rhizosphere.

Keywords: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, sugar cane, growth promotion.

6.3 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma importante cultura para economia do Brasil e passa por aumentos anuais em sua área de produção, sendo essas novas áreas, geralmente, de baixa fertilidade (CONAB, 2015). A produção de cana-de-açúcar no Brasil é caracterizada por ser um sistema de agricultura intensiva e que apresenta um fluxo de nutriente consideravelmente elevado, o que acarreta aumento nos gastos com fertilizantes e manutenção do canavial. Diante disso, diversas práticas alternativas à aplicação de fertilizantes químicos nos cultivos dessa cultura e de conservação do solo tem sido investigadas. Uma das práticas que tem dado bons resultados é a rotação de cultura com plantas da família Fabaceae (PARK et al., 2010; SOARES et al., 2016). A rotação de cultura se caracteriza como um sistema de cultivo, em uma mesma área, de diferentes espécies seguindo uma sequência pré determinada. Diversas culturas leguminosas são usadas em rotação no cultivo de cana-de-açúcar, sendo as mais comuns a crotalária (*Crotalaria juncea*), a soja (*Glycine max*), a mucuna (*Mucuna pruriens*) e o amendoim (*Arachis hypogaea*) (AMBROSANO et al., 2011). A prática de rotação de cultura em cultivos de cana-de-açúcar pode contribuir para o controle da população de pragas e doenças (SHOKO & ZHOU, 2009), suprimir ervas daninhas de difícil controle químico (SOARES et al., 2016).

Em função de seu potencial de fixação de nitrogênio em associação com rizóbios, as leguminosas representam, também, uma alternativa ao suprimento, substituição ou complementação da adubação de N mineral e recomposição da fertilidade do solo (SCIVITTARO et al., 2000). Uma hipótese geral sobre os benéficos da presença de culturas leguminosas em área de cultivo de plantas não leguminosas, é a transferência do N da fixação biológica de nitrogênio realizado nas leguminosas para as plantas não leguminosas presentes na área, embora os resíduos da decomposição de leguminosas também possam gerar maiores concentrações de N no solo e beneficiar as outras culturas (CHALK, 1998).

Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado que os processos microbianos possuem uma particular importância para a qualidade do solo, dados seus papéis essenciais na dinâmica do carbono (C) e do nitrogênio (N) do solo (LI et al., 2017; WARDLE et al., 1999). Paungfoo-lonhienne et al. (2017), por exemplo, mostraram que a rotação de cultura com amendoim ou soja, afeta a comunidade microbiana nitrificante do solo, podendo diminuir as perdas de N por lixiviação. Nesse sentido, conhecer o impacto de cultivos prévios no sistema de produção de cana-de-açúcar sobre o microbioma do solo pode ajudar no direcionamento de manejos do sistema de produção para formação de uma microbiota benéfica para a cultura. Portanto, o presente estudo tem como objetivo compreender como o cultivo prévio pode alterar a abundância de microrganismos associados às raízes de cana-de-açúcar.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Delineamento Experimental

Um experimento composto por duas etapas foi realizado na Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ para estudo do efeito da rotação de cultura no microbioma rizosférico de cana-de-açúcar. Para isso, solo classificado como Cambissolo flúvico eutrófico coletado na área experimental da UFRRJ - Campos dos Goytacazes-RJ, com mais de 10 anos consecutivos de cultivo intensivo de cana-de-açúcar foi homogeneizado e peneirado para utilização em vasos de 10 L.

Resumidamente, a primeira etapa foi o cultivo prévio, em vasos, de (1) soja; (2) amendoim; ou (3) braquiária ou (4) pousio sem cultivo. Em uma segunda etapa foi foram plantados minitoletes de cana-de-açúcar nos vasos com o mesmo solo (Figura 49).

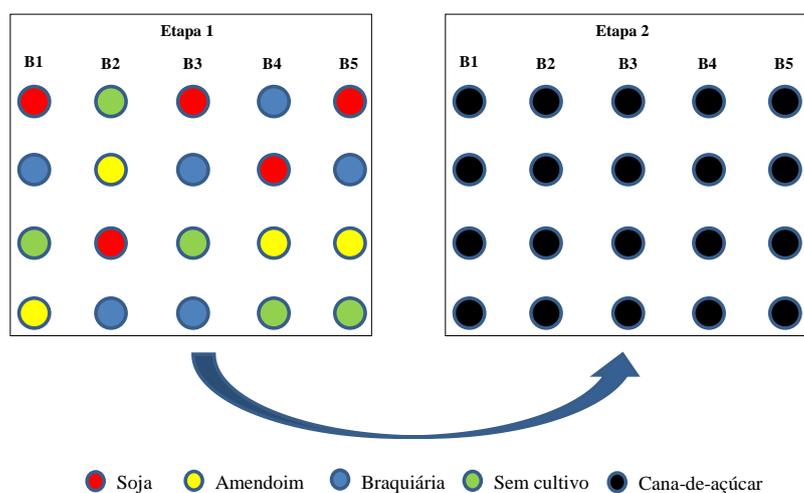


Figura 16. Esquema experimental do ensaio de rotação de cultura de cana-de-açúcar em vasos de 10 L com solo Cambissolo flúvico coletado de canalial organizados em blocos casualizados (B1; B2; B3; B4 e B5) com cinco repetições. Na **Etapa 1** foram cultivadas por 120 dias culturas que antecederam a cana-de-açúcar (amendoim, soja e braquiária) ou desixado em pousio sem cultivo. A **Etapa 2** seguiu com o plantio de mudas de cana-de-açúcar nos mesmos vasos após coleta de amostras e incorporação dos restos vegetais ao solo.

6.4.1.1 Plantio de soja, amendoim e braquiária e pousio

A primeira etapa teve início em setembro de 2019. O experimento foi montado em vasos de 10 L com solo. As características de fertilidade do solo na profundidade de 0-20 cm foram disponibilizadas pela instituição onde o solo foi coletado (Tabela 13). Foram coletadas e armazenadas a -80 °C, para posterior extração de DNA total, cinco amostras do solo do canalial após ser homogeneizado e peneirado. O experimento foi realizado em blocos casualizados com cinco repetições e quatro tratamentos: cultivo de braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. marandu), cultivo de amendoim (*Arachis hypogaeae* cv. IAC-TATU), cultivo de soja (*Glycine max* cv. NA5909 RR) e controle sem cultivo (Pousio). Essa primeira fase teve duração de 120 dias (dezembro de 2019), quando já estavam em fase de enchimento de grãos da fase reprodutiva (Figura 17). Após esse período, a parte aérea das plantas foram cortadas, picotadas e deixadas sobre o solo nos vasos por 30 dias para permitir sua decomposição parcial e o reaproveitamento dos nutrientes do solo (Figura 17). Após os 30 dias, o solo de cada vaso foi destorroado e homogeneizado para coleta de amostras do solo e armazenamento a -80 °C para posterior extração de DNA e realização de análise química de fertilidade do solo. Os restos

vegetais não decompostos foram incorporados no solo do vaso. Nesse momento, foi constatada a presença de nódulos radiculares nas plantas de soja e amendoim.



Figura 17. Experimento rotação de cultura com amendoim, braquiária e soja e pousio sem cultivo, aos 120 dias após plantio. As plantas foram trituradas e retornadas aos seus respectivos vasos para remobilização de nutrientes por 30 dias.

Tabela 12. Análise de solo utilizado no experimento de rotação de cultura coletado na área experimental da UFRRJ em Campos dos Goytacazes-RJ.

Identificação	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	C	MO	V	Fe	Cu	Zn	Mn	S	
Lab.	Int.	água	mg.dm ³		cmolc.dm ³				%						cmolc.dm ³	
492/19	1. 0-20	5,7	7	107	4,1	2,9	0,00	3,99	1,51	2,60	64,9	62,4	2,4	5,5	52,2	7,04
493/19	2. 0-20	5,7	7	112	4,1	2,9	0,00	3,93	1,44	2,48	65,3	67,2	2,4	5,4	54,0	6,95

6.4.1.2 Plantio de cana-de-açúcar

Em janeiro de 2020, minitoletes de cana-de-açúcar (cv. RB867515) coletados na área experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ, foram plantados nos vasos (quatro minitoletes por vaso). Durante 30 dias após o plantio, o crescimento da parte aérea foi acompanhado através da medição do comprimento com régua graduada. Trinta dias após o plantio (fevereiro de 2020), a parte aérea das plantas foram coletadas para determinar massa seca, nesse momento o solo dos vasos foi destorroado e homogeneizado para coleta de amostras para análise química e de fertilidade. Enquanto que o sistema radicular da cana-de-açúcar foi utilizado para coleta de solo rizosférico para posterior extração de DNA.

Para a coleta do solo rizosférico de cana-de-açúcar, o sistema radicular de cada planta de cana foi submerso em solução salina com Tween 20 (0,01%) esterilizada e agitados por 15 min a 150 rpm em agitador orbital a temperatura ambiente (JÚNIOR et al., 2019). Em seguida, as raízes foram retiradas da solução e os tubos, contendo o solo de rizosfera em suspensão, foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos para precipitar o solo rizosférico e

microrganismos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e os tubos com o solo foram armazenados a -80 °C.

6.4.2 Extração de DNA

Quarenta e cinco amostras no total (cinco repetições dos quatro tratamentos dos vasos nas etapas 1 e 2 do experimento mais cinco do solo original do canavial) foram utilizadas para extração de DNA. A extração do DNA total do solo foi realizada com o kit PowerSoil® DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 0,25 g de amostra de solo em tubos PowerBead fornecidos no kit, que foi misturado por vórtex. Em seguida foi adicionado 60 µL da solução C1. Posteriormente, os tubos foram agitados horizontalmente em vórtex com adaptadores, à velocidade máxima, por 10 minutos. Após a agitação, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 30 segundos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para um tubo coletor de 2 mL disponibilizado no kit. Foi adicionado 250 µL da solução C2 e a mistura foi agitada no em aparelho tipo vórtex por 5 segundos. Posteriormente, as misturas foram incubadas a 4 °C por 5 minutos. Os todos foram centrifugados em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 x g. Em seguida, para cada amostra, foram transferidos até 600 µL de sobrenadante para um tubo de coleta de 2 ml. Após a transferência, foi adicionado 200 µL da solução C3, os tubos foram agitados em aparelho tipo vórtex brevemente e incubados a 4 °C por 5 minutos. Uma nova centrifugação em temperatura ambiente foi conduzida por 1 minuto a 10.000 x g. Após a centrifugação, até 750 µL de sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de coleta. Foi adicionado 1200 µL da solução C4 aos sobrenadantes, as misturas foram agitadas em aparelho vórtex por 5 segundos. após essa etapa, alíquotas de aproximadamente 675 µL foram adicionados em filtros rotativos apoiados em tubos de coleta (disponibilizado no kit). Esses filtros foram centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 500 µL da solução C5 a cada tubo de filtração e os mesmos foram centrifugados à temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 x g. O conteúdo do tubo de coleta foi descartado e uma nova centrifugação foi realizada por 1 minuto a 10.000 x g. Os filtros rotativos foram transferidos para tubos de coleta e foram adicionados 100 µL da solução C6 ao centro da membrana dos filtros, os quais foram centrifugados a 10.000 x g por 30 segundos. Por fim, os filtros rotativos foram descartados.

A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,85% e a quantificação ocorreu por leitura em fluorímetro Qubit® (Invitrogen) usando o Kit Qubit® DNA Assay (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

6.4.3 Sequenciamento

O DNA extraído foi preparado para amplificação da região V3 – V4 do gene 16S rRNA e sequenciamento foi utilizando o *Next-Generation* Illumina MiSeq™ (CAPORASO et al., 2012). O preparo das bibliotecas foi realizado na empresa WEMSEQ Pesquisa e Desenvolvimento Sociedade Simples (Curitiba, PR). A metodologia adota o uso de sequências adaptadoras nos *primers* possibilitando o sequenciamento de muitas amostras em pouco tempo (CAPORASO et al., 2012). O protocolo adotado pela empresa, inclui as sequências de pares de *primers* para as regiões V3 e V4 que criam um único amplicon de aproximadamente 460 bp (KLINDWORTH et al., 2013). Os *primers* e condições de PCR foram essencialmente os descritos no guia de preparação da Biblioteca de Sequenciamento Metagenômica Illumina 16S [Illumina] (<https://web.uri.edu/gsc/files/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>). Após sequenciamento, a empresa realizou a demultiplexação das sequências e filtragem quanto a sua qualidade (Q score menor que 30 foram desconsideradas).

6.4.4 Análise de dados e estatística

Para análise do 16S rRNA foi utilizada a pipeline DADA2 (1.8) (CALLAHAN et al., 2016) incorporada ao software R (TEAM, 2019). O DADA2, ao final das análises, gera uma tabela de Variante de Sequência de Amplicon (ASV), um análogo de alta resolução da tabela OTU tradicional (OTU, unidade taxonômica operacional), que registra o número de vezes que cada variante exata de sequência do amplicon foi observada em cada amostra (CALLAHAN et al., 2016). As leituras de sequência foram filtradas usando os parâmetros recomendados do pipeline DADA2 (ou seja, um limite de erro esperado de 2 combinado com o corte de 10 nucleotídeos do início e do final de cada leitura). Posteriormente, as sequências foram unidas e classificadas utilizando o banco de dados SILVA (versão 132). A tabela ASV gerada foi convertida em objeto phyloseq, usando o pacote phyloseq (MCMURDIE & HOLMES, 2013).

As abundâncias de ASVs, curvas de rarefação e medidas de diversidade alfa (Shannon) foram calculadas para cada tratamento pelo pacote phyloseq (MCMURDIE & HOLMES, 2013) no ambiente R (v. 4.0.2) (TEAM, 2019). As figuras foram construídas nos softwares Excel (Microsoft) e R (R TEAM, 2019) usando o pacote ggplot2 (WICKHAM et al., 2019).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Crescimento da Cana-de-Açúcar e Fertilidade do Solo Após as Coletas

Não houve diferença significativa no comprimento da parte aérea das plantas entre os tratamentos durante o início do desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar cultivadas nos vasos. Entretanto, na terceira semana após o plantio, as plantas cultivadas nos vasos que continham braquiária apresentaram diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Figura 18). Não foi mais observada diferença significativa no comprimento das plantas para as semanas seguintes de avaliação após o plantio. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a massa da parte aérea seca da cana-de-açúcar (Figura 19). A análise de fertilidade química também não mostrou diferenças significativas entre o solo dos vasos com plantio das culturas da soja, amendoim, braquiária ou pousio. O cultivo de cana-de-açúcar nesses mesmos vasos após 30 dias da colheita dessas culturas também não modificou a fertilidade do solo (Tabela 14).

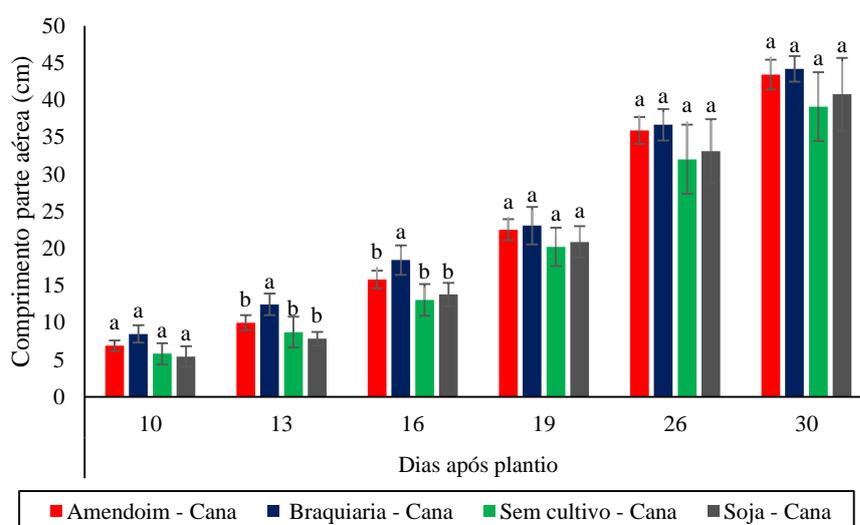


Figura 18. Comprimento da parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 30 dias após o plantio em vasos que tiveram amendoim, braquiária, soja ou sem cultivo anteriormente. Teste scott-knott em $p < 0,05$.

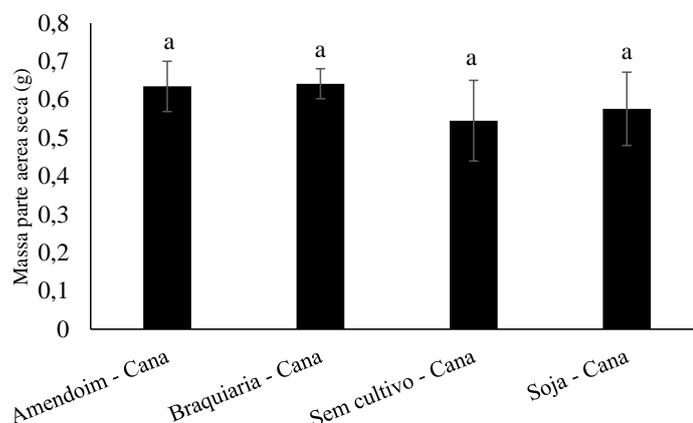


Figura 19. Massa seca da parte aérea de cana-de-açúcar cv. RB867515 aos 30 dias após o plantio em vasos que tiveram amendoim, braquiária, soja ou sem cultivo (pousio) anteriormente. Teste scott-knott em $p < 0,05$.

Tabela 13. Análise química de amostras de solo coletada dos vasos após 120 dias do plantio de soja, braquiária, amendoim ou pousio (**Etapa 1**) e de amostras coletada 30 dias após plantio de cana-de-açúcar cv. RB867515 (**Etapa2**).

Tratamento	C		N		K		P		Mg		Ca		pH	
%	 mg/L	 cmolc/d			Unid.	
Etapa 1														
Amendoim	1,34	0,01	0,15	0,002	87,55	8,11	7,64	1,01	3,09	0,05	6,53	0,62	5,60	0,07
Braquiária	1,32	0,03	0,14	0,003	82,20	1,49	6,00	0,27	3,11	0,03	5,78	0,09	5,80	0,05
Sem cultivo	1,34	0,02	0,14	0,003	83,73	5,42	7,93	0,46	3,03	0,04	6,13	0,32	5,76	0,02
Soja	1,32	0,02	0,14	0,002	77,59	2,77	6,33	1,68	2,94	0,10	6,14	0,37	5,75	0,05
C.V.	3,5		4,2		14,8		32,7		4,0		8,2		1,6	
Etapa 2														
Cana-Amendoim	1,22	0,1	0,15	0,00	84,4	2,7	8,8	0,2	3,3	0,12	5,78	0,1	5,5	0,0
Cana-Braquiária	1,25	0,0	0,14	0,00	86,0	3,1	9,3	0,5	3,3	0,08	5,84	0,1	5,8	0,0
Cana-Sem cultivo	1,18	0,0	0,14	0,00	78,8	1,3	9,5	0,3	3,3	0,07	5,87	0,2	5,9	0,2
Cana-Soja	1,18	0,0	0,14	0,00	80,1	2,6	9,5	0,2	3,2	0,05	5,89	0,2	5,7	0,0
C.V.	7,3		3,2		6,5		8,0		3,6		6,7		4,2	

C: carbono; N: nitrogênio. K: potássio; P: fosforo; Mg: magnésio; Ca: cálcio; C.V.- Coeficiente de variação. Médias seguidas de letras distintas, para cada variável, diferem entre si no teste **scott knott** em $p < 0,05$. EP \pm - valor de erro padrão de cada média.

5.5.2 Composição Microbiana

A filtragem dos dados deu origem a uma curva de rarefação satisfatória (Figura 20). A curva de rarefação determina a relação entre o número de taxas (ASVs) estimado em uma determinada amostra e o número de taxas total da análise.

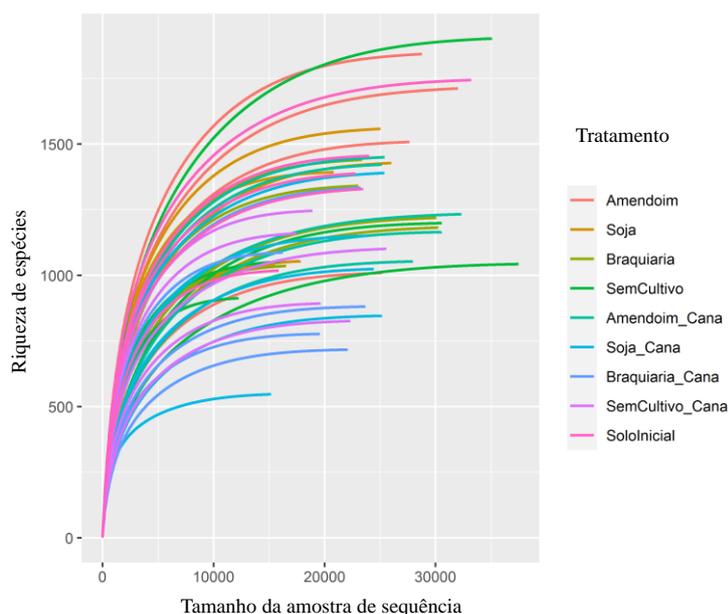


Figura 20. Curvas de rarefação para riqueza de espécies (ASVs) em função do tamanho da amostra de sequência total em amostras de solo oriundo de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (Sem Cultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e Sem Cultivo_Cana).

Foi observado maior diversidade de ASVs nas amostras coletadas de solo total, independente do tratamento utilizado em relação as amostras coletadas da rizosfera de cana-de-açúcar quando a diversidade alfa foi avaliada pelo índice de Shannon (Figura 21). A diversidade alfa refere-se principalmente ao número e a abundância de espécies dentro de uma comunidade, e pode ser visualizada utilizando diversos índices, sendo que o índice de Shannon atribui maior peso a espécies raras (MAGURRAN, 1988). De modo geral, a rizosfera tende a apresentar uma menor riqueza de espécies, uma vez que os microrganismos presentes nela estão mais estreitamente relacionados à planta.

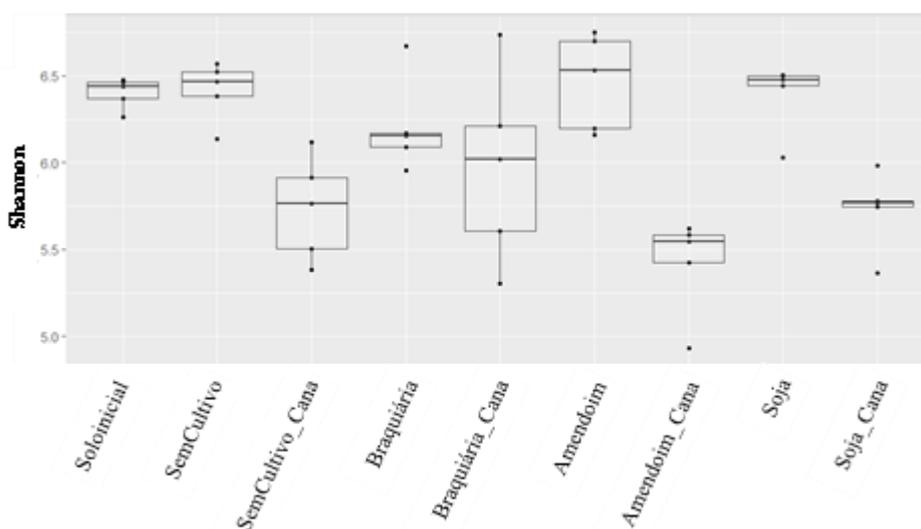


Figura 21. Diversidade alfa utilizando índice de Shannon para visualização da diversidade de espécies em amostras de solo oriundas de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (Sem Cultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e SemCultivo_Cana). Figura elaborada por Luc Rouws.

Após a quantificação da composição da comunidade microbiana, os ASVs mais frequentes tiveram suas identidades relacionadas com rizóbios (*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*), *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Gaiella*, *Candidatus Udaeobacter* e *Nocardioides* (Figura 22). Houve também uma alta proporção de ASVs classificados como outros, que representa ASVs de baixa abundância mais os ASVs que não possuem identidade no banco de dados. Mesmo com as ferramentas de sequenciamento em larga escala ainda há muitos microrganismos desconhecidos nos microbiomas do solo (FIERER, 2017; VITORINO & BESSA, 2018). Souza et al. (2016) estudando o microbioma em todas as partes de cana-de-açúcar, encontraram mais de 35000 unidades taxonômicas operacionais associadas, entre fungos e bactérias. Esses autores, ainda observaram uma distinção clara nas comunidades bacterianas e fúngicas entre as amostras abaixo do solo (rizosfera, raiz endofítica e solo a granel) e de órgãos acima do solo (caules e folhas).

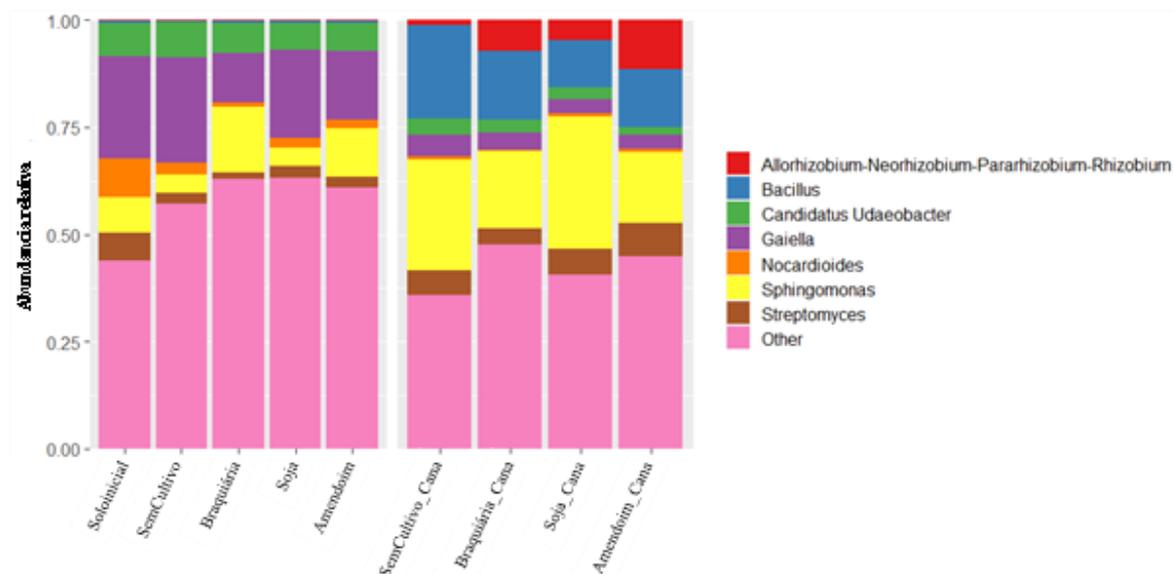


Figura 22. Abundância relativa de sequências baseadas no gene 16S rRNA de gêneros mais abundantes em amostra de solo oriundo de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (SemCultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e SemCultivo_Cana). Figura elaborada por Luc Rouws.

Abundância de (Brady)rizóbios na rizosfera de cana-de-açúcar

Comparando as origens das amostras coletadas para análise, foi observada uma maior abundância relativa de rizóbios (*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*) na rizosfera de cana-de-açúcar em relação às amostras de solo dos cultivos anteriores (Figura 22).

Além disso, o cultivo prévio de qualquer uma das espécies (amendoim, braquiária e soja) aumentou a abundância de rizóbios na rizosfera de cana-de-açúcar, quando comparado com a rizosfera da cana-de-açúcar cultivada no solo sem cultivo prévio (Figura 22). Como observado na Figura 22, de modo geral, não houve presença de ASVs relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* entre os mais abundantes no solo inicial, dos cultivos prévios ou rizosfera de cana-de-açúcar. Além disso, a abundância de ASVs relacionado a *Bradyrhizobium* diminuiu na rizosfera de cana-de-açúcar (Figura 23B), enquanto a de outros rizóbios aumentou (Figura 23A). Esses resultados contrastam com os obtidos por Solanki et al. (2020) que observaram uma maior abundância do gênero *Bradyrhizobium* ao analisarem apenas as bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de cana-de-açúcar.

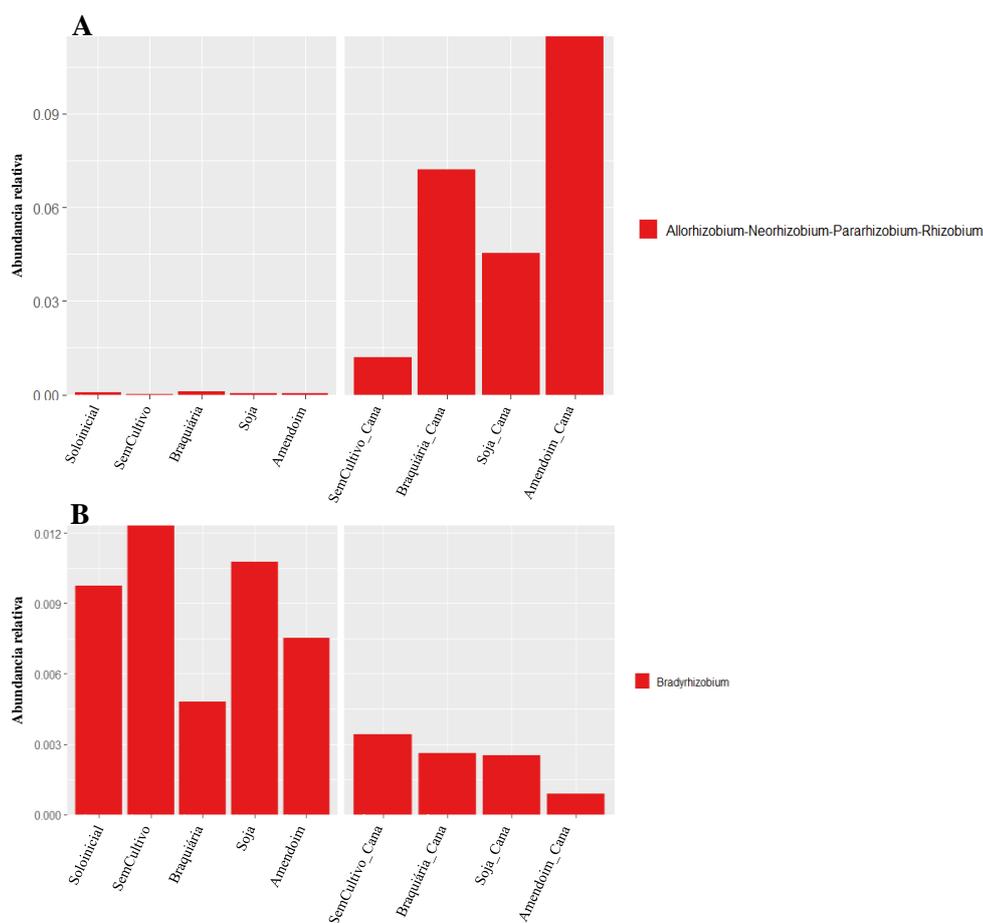


Figura 23. Abundância relativa de sequências baseadas no gene 16S rRNA de amostra de solo oriundo de campo cultivado com cana-de-açúcar (Solo inicial) usado para o cultivo em vasos com soja, amendoim, braquiária ou pousio (SemCultivo), seguido com cultivo de cana-de-açúcar em todos os vasos (Amendoim_Cana, Soja_Cana, Braquiária_Cana e SemCultivo_Cana): (A) abundância relativa ASVs de rizóbios; e (B) para ASVs de *Bradyrhizobium*. Figura elaborado por Luc Rouws.

Vale destacar que muitos fatores podem influenciar a formação do microbioma rizosférico em plantas, tais como tipo de solo, umidade, genótipo, estágios de desenvolvimento (BURNS et al., 2015; CHAPARRO et al., 2012; LUNDBERG et al., 2012) e até as condições de estresse da planta (PEREIRA et al., 2021). Contudo, os chamados endófitos competentes ainda podem se associar a planta mesmo sob condições adversas e com extensa variação em taxons inferiores (AGLER et al., 2016). Gao et al. (2019) observaram que a proporção dos gêneros bacterianos dominantes na rizosfera da cana-de-açúcar recém plantada e da cana soca diferiram significativamente. No caso do gênero *Bradyrhizobium*, a proporção aumentou com

a extensão da soca. Portanto, é possível que a fase de crescimento da planta ou a condição de cultivo não tenha favorecido os *Bradyrhizobium* do solo a tempo de estabelecer uma associação efetiva capaz de aumentar sua abundância junto às raízes de cana-de-açúcar.

Abundância de *Bacillus*

A abundância de ASVs do gênero *Bacillus* também aumentou consideravelmente na rizosfera de cana-de-açúcar em relação as amostras de solos dos cultivos anteriores ou pousio (Figura 22). Entretanto, ao contrário da abundância de ASVs relacionados a rizóbios, a abundância de *Bacillus* foi maior nos vasos que continham o solo em pousio.

O gênero *Bacillus* tem sido alvo de diversas pesquisas para uso como promotor de crescimento de muitas espécies de planta, inclusive cana-de-açúcar (RATÓN et al., 2012). Esse gênero se encontra bastante difundido na rizosfera de cana-de-açúcar, de onde foi isolada e classificada a estirpe tipo da espécie *Bacillus rhizosphaerae* (MADHAIYAN et al., 2011). Estirpes de bacilos isoladas de rizosfera de cana-de-açúcar apresentaram capacidade para solubilizar fosfato e cálcio, secretar o fitohormônio etileno e hidrolases, produzir ácido indol-3-acético, atividade de diversas enzimas como catalase, fenilalanina-amônia-liase, superóxido dismutase, quitinase e glucanase, além de atividade inibitória contra fungos patogênicos *Sporisorium*, *Ceratocystis Curvularia* e *Fusarium* e capacidade de FBN (RATÓN et al., 2012; SINGH et al., 2020; SOLANKI et al., 2019).

Abundância de *Sphingomonas*

O gênero *Sphingomonas* apresentou maior abundância relativa na rizosfera de cana-de-açúcar em relação ao solo com os cultivos prévios ou sem cultivo, embora esse gênero já estivesse em alta abundância relativa no solo, ao contrário dos rizóbios e *Bacillus* (Figura 22). Outro ponto a ser observado é que, quando comparado com o solo inicial do canavial, o gênero *Sphingomonas* apresentou menor abundância relativa no tratamento de pousio (sem cultivo) e no cultivo com soja. Entretanto, ao ser cultivado cana-de-açúcar novamente nos vasos que continham esses tratamentos, houve um grande aumento na abundância relativa desse gênero em sua rizosfera, principalmente nos vasos que haviam sido cultivados com soja. Além disso, Solanki et al. (2020), ao estudarem grupos de bactérias diazotróficas na rizosfera de cana-de-açúcar cultivada em monocultivo ou em consórcio com amendoim ou soja, observaram maior abundância relativa de *Sphingomona* na rizosfera de cana-de-açúcar em consórcio com soja. Uma alta população de *Sphingomonas* também foi observada nos tecidos internos de cana-de-açúcar por Santos et al. (2017).

Gao et al. (2019), através de sequenciamento do 16S rRNA, observaram que o gênero *Sphingomonas* foi dominante na comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar. As bactérias pertencentes a esse gênero são bastante conhecidas por sua capacidade de catabolizar compostos aromáticos, podendo ser aplicadas como uma fonte biológica ecológica para limpar locais contaminados e promover o crescimento de plantas confrontadas com perturbações ambientais (ASAF et al., 2018; ZHAO et al., 2017). Foram reportados diversos efeitos benéficos de *Sphingomonas* para o meio ambiente, como degradação de resíduo dos herbicidas diuron (SORENSEN et al., 2013) e isoproturon (BENDING et al., 2003) e auxiliar na fitorremediação de zinco quando inoculada em *Sedum alfredii* (CHEN et al., 2014). No crescimento de plantas, *Sphingomonas* demonstrou capacidade de realizar controle biológico de *Fusarium poae* na cultura do milho (WACHOWSKA et al., 2013) e promover crescimento de tomate sob estresse salino (KHAN et al., 2017). Esse gênero também possui capacidade de fixar nitrogênio em vida livre, sendo indicado como alternativa viável para inoculação de milho (SUN et al., 2010) e arroz (ISLAM et al., 2012; XIE & YOKOTA, 2006).

Abundância de *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* seguiu o mesmo comportamento que o *Sphingomonas*, mas apresentando uma abundância relativa a todos os tratamentos inclusive a este último (Figura 22). Diversos trabalhos relataram a capacidade de *Streptomyces* spp. em produzirem compostos, como 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, IAA e sideróforos, que podem melhorar o crescimento das plantas através da amenização dos efeitos do estresse (PALANIYANDI et al., 2014; WANG et al., 2019). Culturas como milho (ALY et al., 2003), tomate (PALANIYANDI et al., 2014) e trigo (ALY et al., 2012) tiveram incrementos em seu crescimento quando inoculadas com estirpes de *Streptomyces* em condições de estresse salino. Estirpes de *Streptomyces* também incrementaram o crescimento de cana-de-açúcar, revelando forte potencial para seu uso no aumento da tolerância a seca dessa cultura (KRUASUWAN & THAMCHAIPENET, 2016; WANG et al., 2019). Além disso, em uma coleção de 135 endófitos de raízes de cana-de-açúcar isolada por Kruasuwan & Thamchaipenet (2016), 47% foi representada pelo gênero *Streptomyces*, indicando alta ocorrência desse gênero em cana-de-açúcar. Por outro lado, na coleção composta por 64 bactérias diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar por Solanki et al. (2019), 11% era do gênero *Streptomyces*, o que pode ser uma indicação de que esse gênero pode estar contribuindo para FBN associada a essa cultura.

Abundância de *Gaiella*

O gênero *Gaiella* apresentou comportamento inverso ao observado para o *Sphingomonas*. Uma alta abundância relativa do gênero *Gaiella* foi observado no solo dos tratamentos iniciais, enquanto que na rizosfera de cana-de-açúcar sua abundância relativa estava menor que a do solo (Figura 22). *Gaiella* é um gênero, com apenas uma espécie descrita (*Gaiella oculata*), pertencente à família *Gaiellaceae* da ordem *Gaiellales* do filo Actinobactéria, cuja classificação se deu a pouco tempo (ALBUQUERQUE et al., 2011). A capacidade das Actinobactérias decompor matéria orgânica no solo é bem conhecida, pois resulta em grande contribuição para o ciclo do nitrogênio e carbono nas camadas mais superficiais (LACEY, 1973; LI et al., 2014, 2017). No estudo de Li et al. (2017), o gênero *Gaiella* demonstrou ter participação nesse processo. Esses autores utilizaram o sequenciamento do 16S rRNA para investigar o microbioma bacteriano em um solo que foi por décadas tratado com fertilizantes inorgânicos e/ou orgânicos e investigar potenciais ligações entre parâmetros de nutrientes do solo e taxa bacteriana específica. O resultado mostrou a presença de *Gaiella* entre as dez taxas mais influentes nas condições de solo com esterco mais NPK (nitrogênio, fosforo e potássio) e no solo com palha mais NPK. Em estudo mais recente, Zanhg et al 2019 usaram o sequenciamento 16S rRNA do solo para explorar a influência da retenção da palha de cana-de-açúcar no canavial nas comunidades bacterianas do solo e atividades enzimáticas. Esses autores observaram que a retenção de palha no canavial enriqueceu a camada mais superficial do solo com bactérias que decompõem a lignocelulose e contribuem para a ciclagem de nutrientes (C e N), com participação de gênero *Gaiella* entre os mais abundantes.

Abundância de *Candidatus Udaeobacter*

No presente estudo, foi observado alta abundância relativa do gênero *Candidatus Udaeobacter* no solo dos tratamentos iniciais, enquanto que na rizosfera de cana-de-açúcar sua abundância relativa estava menor que a do solo, assim como observado para o gênero *Gaiella* (Figura 22). O gênero *Candidatus Udaeobacter* pertence ao filo *Verrucomicrobiota* e possui representantes em ecossistemas de solo em todo o planeta (BREWER et al., 2016). Willms et al. (2020) demonstraram que representantes da *Candidatus Udaeobacter* apresentam muitos tipos de resistência a antibióticos e até se beneficiam da liberação de antibióticos no solo, mesmo considerando amostras de solo de diferentes tipos de ecossistema, como floresta de faias, prados e pastagens. Brewer et al. (2016) sugerem que *Candidatus Udaeobacter copiosus* tenha sacrificado a versatilidade metabólica para reduzir os custos metabólicos na síntese de

aminoácidos e vitaminas, que são potencialmente adquiridos do ambiente do solo, para se tornar dominante no ambiente.

Abundância de *Nocardioides*

O gênero *Nocardioides* apresentou alta abundancia relativa no solo inicial do canavial, mas sofreu grande diminuição quando avaliado no solo em pousio ou cultivados com amendoim, soja e, principalmente, braquiária, enquanto que a sua abundancia relativa foi ainda menor na rizosfera de cana-de-açúcar, principalmente, na rizosfera de cana-de-açúcar cultivada anteriormente com braquiária (Figura 22). O gênero *Nocardioides* pertence ao filo *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales* e família *Nocardiaceae*. Foi descrito por Prauser (1976) e atualmente conta com 137 espécies descritas (<https://lpsn.dsmz.de/search?word=Nocardioides>, acessado em 03/2021). Li et al. (2020) relacionaram o efeito da aplicação de fertilizantes orgânico + fertilizante químico ou apenas fertilizante químico no crescimento da cana-de-açúcar com o microbioma formado em cada situação. Seus resultados mostraram que a aplicação de fertilizante orgânico aumentou significativamente o teor de açúcar e a produtividade da cana-de-açúcar. Nesse tratamento o filo de Actinobactéria foi um dos mais dominantes, sendo o gênero *Nocardioides* um dos principais gêneros presente. Meena et al. (2020) observaram grande potencial do uso de *Nocardioides* para defesa contra o estresse salino na cultura de trigo influenciando o crescimento da planta de forma positiva através de atributos promotores de crescimento como a produção de sideróforo e fitohormônio (ácido indol-3-acético (IAA) e ácido salicílico).

Considerações

As bactérias presentes na rizosfera de plantas são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR). Esses organismos estão atraindo cada vez mais atenção da comunidade científica devido aos benefícios que podem proporcionar às plantas hospedeiras, como maior crescimento, melhor desenvolvimento e proteção contra patógenos (PEREIRA et al., 2021). No presente estudo, foi possível observar que a proporção das bactérias no solo é diferente da proporção formada na rizosfera de cana-de-açúcar e que a cultura anterior pode interferir nesse processo. Lundberg et al. (2012) observaram que a composição da microbiota da rizosfera varia para a mesma espécie de planta, de acordo com a fonte disponível de microrganismos em cada solo, indicando que o funcionamento dos componentes da rizosfera também direciona a seleção dos organismos. Esses autores observaram também que algumas bactérias variam quantitativamente entre plantas de diferentes estágios de desenvolvimento e genótipo. Com relação aos estágios de desenvolvimento das plantas, as mudanças observadas nas comunidades microbianas associadas às plantas provavelmente estão relacionadas a mudanças no seu metabolismo durante o ciclo de vida (CHAPARRO et al., 2014). Por exemplo, o estágio de desenvolvimento das plantas de milho é um forte impulsionador da composição da comunidade bacteriana na rizosfera, mais do que o tipo de solo e o genótipo da planta (COTTA et al., 2013).

Na rizosfera de cana-de-açúcar, mesmo entre os mais abundantes, os gêneros *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* e grupo de rizóbios foram os mais favorecidos (Figura 24). Todos esses grupos de microrganismos possuem relatos de benefícios ao crescimento vegetal. Isso indica que grupos microbianos benéficos podem ser enriquecidos na rizosfera (GAO et al., 2019). Embora a última etapa do experimento tenha sido com plantio de cana-de-açúcar, as culturas anteriores tinham metabolismo diferentes, o que pode modificar o microbioma do solo e afetar os microrganismos acessíveis para cana-de-açúcar. De qualquer forma, a maioria dos gêneros com maior abundancia na rizosfera de cana-de-açúcar possui relato de fixação biológica de nitrogênio associado a essa cultura. O que mostra que a rotação de cultura favorece o enriquecimento de bactérias diazotróficas benéficas na rizosfera de cana-de-açúcar, assim como observado, também, por Solanki et al. (2019).

6.6 CONCLUSÃO

A rizosfera de cana-de-açúcar possui menor riqueza de ASVs em relação ao solo não rizosférico;

O solo inicial do canavial, possuía baixa abundância de ASVs relacionados a *Bradyrhizobium* e diminuiu ao ser cultivado cana-de-açúcar novamente;

O cultivo prévio de culturas aumentou a abundância de ASVs relacionados a rizóbios na rizosfera de cana-de-açúcar;

A rizosfera de cana-de-açúcar aumenta a abundância de ASVs relacionados aos gêneros *Sphingomonas* e *Bacillus* e diminui a abundância dos ASVs relacionados a *Gaiella* e *Candidatus udaeobacter* em relação ao solo total;

De modo geral, o cultivo prévio aumentou a abundância de ASVs relacionadas a grupos taxonômicos com capacidade diazotrófica na rizosfera de cana-de-açúcar, independente da espécie vegetal previamente cultivada.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do estudo da diversidade de microrganismos associados à cana-de-açúcar, foi observado que em sua rizosfera há uma diversidade de microrganismos ainda não explorada como promotores de crescimento, mas que possuem capacidade em proporcionar benefícios por meio de diversos mecanismos tais como a fitoremediação do solo, a produção de fitorhomonios, as atividades enzimáticas para ciclagem de nutrientes e a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Além disso, foi observado que a prática de rotação de cultura, com o cultivo prévio com amendoim, soja ou braquiária é capaz de aumentar a abundância de rizóbios na rizosfera de cana-de-açúcar.

Ao explorar os possíveis efeitos promotores de crescimento de estirpes de (Brady)rizóbios presente no microbioma de cana-de-açúcar, foi observado que mesmo dentro do gênero *Bradyrhizobium* há estirpes que possuem capacidade de promover o crescimento da cv. RB867515 afetando positivamente diferentes características, podendo melhorar o desenvolvimento do sistema radicular (volume e massa de raiz) e parte aérea (área foliar, teor de nitrogênio e clorofila). Esse é um dos primeiros estudos de aplicação de *Bradyrhizobium* como inoculante na cultura de cana-de-açúcar e, portanto levanta alguns pontos para trabalhos futuros tais como: (1) entender o funcionamento dos mecanismos de ação de cada característica de crescimento afetada por essas estirpes; (2) avaliar o efeito da inoculação mista de estirpes que afetam características diferentes do crescimento da cana; e (3) avaliar inoculação em outras cultivares de cana-de-açúcar e cultivos em outros tipos de solo.

O estudando das singularidades genéticas e funcionais de algumas dessas estirpes de *Bradyrhizobium* mostrou que algumas delas apresentam afinidade para FBN em simbiose e vida livre. Essas estirpes possuem em seu genoma, a presença de dois conjuntos de genes responsáveis pela FBN, onde um deles demonstrou mais relação com a capacidade de FBN em vida livre. Esse foi um passo importante para o estudo da associação de *Bradyrhizobium* com plantas não leguminosas, uma vez que essas estirpes possam ser utilizadas como um inoculante com dupla aptidão na inoculação de plantas leguminosas e não leguminosas. Além disso, essa informação pode ser usada como um novo parâmetro para o direcionamento na prospecção de novas estirpes fixadoras de nitrogênio para uso em culturas não leguminosas.

Portanto, o conjunto dos resultados obtidos nesse estudo, sugere o uso de (Brady)rizóbios como uma alternativa promissora para aumento da eficiência produtiva de cana-de-açúcar. Contudo, estudos complementares devem ser realizados para que os mecanismos atuantes possam ser compreendidos e explorados em seu máximo potencial.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACINAS, S. G. et al. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629–2635, 2004.
- AGLER, M. T. et al. Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. **PLoS Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–31, 2016.
- ALAZARD, D. Nitrogen fixation in pure culture by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 68, n. 1–2, p. 177–182, 1990.
- ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1298–1307, 2006.
- ALBUQUERQUE, L. et al. *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of *Gaiellaceae* fam. nov. and *Gaiellales* ord. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 595–599, 2011.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p. 1–9, 2003.
- ALY, M. M. et al. Physiological response of *Zea mays* to NaCl stress with respect to *Azotobacter chroococcum* and *Streptomyces niveus*. **Pak J Biol Sci**, v. 6, p. 2073–2080, 2003.
- ALY, M. M.; EL SAYED, H. E. A.; JASTANIAH, S. D. Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. **Journal of American Science**, v. 8, n. 5, p. 667–676, 2012.
- AMBROSANO, E. J. et al. Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p. 810–818, 2011.
- ANDO, S. et al. Detection of *nifH* Sequences in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) And Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 303–308, 2005.
- ANTUNES, J. E. L. **Bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar : estratégia para uma agricultura sustentável**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016.
- ASAF, S. et al. Complete genome sequencing and analysis of endophytic *Sphingomonas* sp. LK11 and its potential in plant growth. **3 Biotech**, v. 8, n. 9, p. 1–14, 2018.
- ASERSE, A. A. et al. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 2, p. 595–609, nov. 2012.
- AVONTUUR, J. R. et al. Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 427–439, 2019.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–15, 2008.
- BALDANI, J. I. et al. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. p. 86–93, 1986.

- BALDANI, J. I. et al. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802–810, 1996.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, 1997.
- BALDANI, J. I. et al. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família Poaceae (antiga gramineae). **Tópicos em ciência do solo**, v. 1, p. 203–271, 2009.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5–6, p. 485–491, 2000.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7–11, 1998.
- BEIJERINCK, M. W. Cultur des *Bacillus radicolica* aus den Knöllchen. **Bot Ztg**, v. 46, p. 740–750, 1888.
- BENDING, G. D. et al. In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide isoproturon is the result of interactions between degradative *Sphingomonas* spp. and Soil pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 827–834, 2003.
- BODDEY, L. H. et al. A Avaliação da Fixação Biológica de N₂ Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática. **EMBRAPA - Documentos 245**, p. 43, 2007.
- BODDEY, R. M. et al. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. **Functional Plant Biology**, v. 28, n. 9, p. 889–895, 2001.
- BODDEY, R. M.; KNOWLES, R. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical reviews in plant sciences**, v. 6, n. 3, p. 209–266, 1987.
- BOIERO, L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 4, p. 874–880, 2007.
- BOMAR, L. et al. Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. **mBio**, v. 2, n. 2, p. 1–8, 2011.
- BREWER, T. E. et al. Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium “*Candidatus Udaeobacter copiosus*”. **Nature Microbiology**, v. 2, n. October 2016, 2016.
- BURBANO, C. S. et al. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 383–389, 2011.

BURNS, J. H. et al. Soil microbial community variation correlates most strongly with plant species identity, followed by soil chemistry, spatial location and plant genus. **AoB PLANTS**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2015.

BURRIS, R. H. **100 years of discoveries in biological N₂ fixation**. Nitrogen fixation: hundred years after: proceedings of the 7th International Congress on N [Triple-bond] Nitrogen Fixation, Koln (Cologne), FRG, March 13-20, 1980/edited by H. Bothe, FJ de Bruijn and WE Newton. **Anais...**Stuttgart: G. Fischer, 1988., 1988

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CARVER, T. et al. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 2012.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 23–31, 1988.

CHARENTREUIL, C. et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5437–5447, 2000.

CHALK, P. M. Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 49, n. 3, p. 303–316, 1998.

CHAPARRO, J. M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489–499, 2012.

CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **ISME Journal**, v. 8, n. 4, p. 790–803, 2014.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, A. Plant growth-promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 1, p. 43–52, 2013.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

CHEN, B. et al. The endophytic bacterium, *sphingomonas samr12*, improves the potential for zinc phytoremediation by its host, *sedum alfredii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

CHERKASOV, N.; IBHADON, A. O.; FITZPATRICK, P. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 90, p. 24–33, 2015.

CLIFTON-BROWN, J. C.; JONES, M. B. The thermal response of leaf extension rate in genotypes of the C₄-grass *Miscanthus*: An important factor in determining the potential productivity of different genotypes. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1573–1581, 1997.

CLISTIANE DOS ANJOS MENDES. **Construção de um modelo de seleção genômica ampla para canade-açúcar (*Saccharum spp.*) no contexto do programa de melhoramento da RIDESA - Goiás.** [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2015.

COENYE, T. et al. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 147–167, 2005.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. cana, v. 4 - Safra 2017/18, n. 1 -. **Primeiro levantamento**, p. 1–28, 2015.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira V.7 - SAFRA 2020/21 - N.2 - Segundo levantamento. p. 3–115, 2020.

COTTA, S. R. et al. Temporal dynamics of microbial communities in the rhizosphere of two genetically modified (GM) maize hybrids in tropical agrosystems. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 589–601, 2013.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**–Bronx. **NY: New York Botanical Gardens**, 1988.

DA SILVEIRA, A. P. D. et al. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 283–295, 2019.

DAVIS, A. S.; JACOBS, D. F. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. **New Forests**, v. 30, n. 2–3, p. 295–311, 2005.

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2180–2187, 1992.

DE MATOS, G. F. et al. *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 9, p. 1251–1258, 2017.

DE OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1–2, p. 23–32, 2006.

DE SANTI FERRARA, F. I. et al. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, v. 353, n. 1–2, p. 409–417, 2012.

DE SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–15, 2016.

DELAMUTA, J. R. M. et al. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART9, p. 3342–3351, 2013.

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 127, n. 2, p. 285–

294, 1966.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DO CARMO SILVA BARRETO, M. et al. Inoculation of endophytic diazotrophic bacteria in micropropagated seedlings of sugarcane (*Saccharum officinarum* sp.). **Environmental Sustainability**, v. 2, n. 1, p. 5–12, 2019.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 5, p. 310–313, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. [s.l.] Embrapa SPI, 1995.

DOS-SANTOS, C. M. et al. A Culture-Independent Approach to Enrich Endophytic Bacterial Cells from Sugarcane Stems for Community Characterization. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 453–465, 2017.

DOS SANTOS, R. L. et al. Changes in Biological Nitrogen Fixation and Natural-Abundance N Isotopes of Sugarcane Under Molybdenum Fertilization. **Sugar Tech**, v. 21, n. 6, p. 925–935, 2019a.

DOS SANTOS, S. G. et al. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, n. August, p. 12–23, 2019b.

DRAPCHO, D. L.; SISTERTON, D.; KUMAR, R. Nitrogen fixation by lightning activity in a thunderstorm. **Atmospheric Environment (1967)**, v. 17, n. 4, p. 729–734, 1983.

EAGLESHAM, A. R. J.; SZALAY, A. A. Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. **Plant Science Letters**, v. 29, n. 2–3, p. 265–272, 1983.

ELBOUTAHIRI, N. et al. Genotypic characterization of indigenous *sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sullae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 979–985, 2009.

EMBRAPA, E. B. D. P. A. **Inoculante para fixação de nitrogênio para cana é lançado pela Basf e Embrapa - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/39688081/inoculante-para-fixacao-de-nitrogenio-para-cana-e-lancado-pela-basf-e-embrapa>>. Acesso em: 16 mar. 2021.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783, 1985a.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783, 1985b.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons**. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.

FERREIRA, N. S. et al. Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-seeds and their effect on plant development. **Plant and Soil**, p. 1–18, 2020.

- FIERER, N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017.
- FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. **Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônomo**, p. 31–44, 2008.
- FISCHER, D. et al. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 83–99, 2012.
- FRANCO, A. A.; DOBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com rhizobium-feijão e influência de diferentes nutrientes. **Embrapa Agrobiologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1967.
- FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 7, n. 8, p. 332–346, 1889.
- FRIED, M.; BROESHART, H. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. **Plant and Soil**, v. 43, n. 1, p. 707–711, 1975.
- GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. **SEA VIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny**CABIOS. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-abstract/12/6/543/231577>>. Acesso em: 3 out. 2019.
- GAO, X. et al. Rhizosphere Bacterial Community Characteristics over Different Years of Sugarcane Ratooning in Consecutive Monoculture. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- GEVERS, D. et al. Defining prokaryotic species Reevaluating prokaryotic species. **Microbiology**, v. 3, n. September, p. 733–739, 2005.
- GIBSON, K. D.; FISCHER, A. J.; FOIN, T. C. Shading and the growth and photosynthetic responses of *Ammannia coccinea*. **Weed Research**, v. 41, n. 1, p. 59–67, 2001.
- GILLIS, M. et al. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 361–364, 1989.
- GIRAUD, E. et al. Effect of Bradyrhizobium photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14795–14800, 2000.
- GIRAUD, E. et al. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1307–1312, 2007a.
- GIRAUD, E. et al. Legumes symbioses: Absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1307–1312, 2007b.
- GOPALASUNDARAM, P.; BHASKARAN, A.; RAKKIYAPPAN, P. Integrated Nutrient Management in Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 14, n. 1, p. 3–20, 2012.
- GOVINDARAJAN, M. et al. Improved yield of micropropagated sugarcane following

inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, v. 280, n. 1–2, p. 239–252, 2006.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 1389–1398, 2004.

GREETATORN, T. et al. Empowering rice seedling growth by endophytic *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 258–266, 2019.

GUREVICH, A. et al. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.

GUTIÉRREZ-MAÑERO, F. J. et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 2, p. 206–211, 2001.

HAAG, A. F. et al. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. n/a-n/a, 2012.

HARA, S. et al. Identification of nitrogen-fixing bradyrhizobium associated with roots of field-grown sorghum by metagenome and proteome analyses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–15, 2019.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 47–81, 1973.

HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. DE S. Um metodo para estimar a área foliar da cana-de-açúcar. **Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 17, n. 5, p. 32–34, 1999.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1–2, p. 1–18, 2008.

HU, Y.; RIBBE, M. W. Nitrogenase and homologs. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 435–445, 2015.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 825–834, 1991.

IKI, T.; AONO, T.; OYAIZU, H. Evidence for functional differentiation of duplicated *nifH* genes in *Azorhizobium caulinodans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, n. 2, p. 173–179, 2007.

INMAM-BAMBER, N. G. Some Physiological Factors Affecting the Optimum Age and Season for Harvesting Sugarcane. **Proceeding of the S A Sugar Technologists' Association**, n. June, p. 1–6, 1991.

INMAN-BAMBER, N. G. Temperature and seasonal effects on canopy development and light interception of sugarcane. **Field Crops Research**, v. 36, n. 1, p. 41–51, 1 jan. 1994.

INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95–

104, 2012.

ISLAM, M. R. et al. Diversity of free-living nitrogen-fixing bacteria associated with Korean paddy fields. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1643–1650, 2012.

JAHN, C. E.; CHARKOWSKI, A. O.; WILLIS, D. K. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 318–324, 2008.

JAMES, E. K. et al. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 6, p. 757–766, 1994.

JIAO, X. et al. Low-temperature leaf photosynthesis of a *Miscanthus* germplasm collection correlates positively to shoot growth rate and specific leaf area. **Annals of Botany**, v. 117, n. 7, p. 1229–1239, 2016.

JOHNSON, G.; NOLAN, T.; BUSTIN, S. A. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 943p. 1–16.

JORDAN, D. C. 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**, v. 32, n. 1, p. 136–139, 1982a.

JORDAN, D. C. 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 Bacteriology**, v. 32, n. 1, p. 136–139, 1982b.

JÚNIOR, I. DE A. M. et al. Occurrence of diverse *Bradyrhizobium* spp. in roots and rhizospheres of two commercial Brazilian sugarcane cultivars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 759–767, 2019.

KANEKO, T. et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v. 9, n. 6, p. 189–197, 2002.

KANESHIRO, T.; KURTZMAN, M. A. Glutamate as a differential nitrogen source for the characterization of acetylene-reducing *Rhizobium* strains. **Journal of applied bacteriology**, v. 52, n. 2, p. 201–207, 1982.

KASCHUK, G. et al. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 2, p. 210–220, 2006.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1229–1244, 2004.

KHAN, A. L. et al. Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 133, p. 58–69, 2017.

KLEINGESINDS, C. K. et al. Sugarcane growth promotion by *Kosakonia* sp. ICB117 an endophytic and diazotrophic bacterium. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 5, p. 105–114, 2018.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2013.

KONDOROSI, E.; MERGAERT, P.; KERESZT, A. A Paradigm for Endosymbiotic Life: Cell Differentiation of Rhizobium Bacteria Provoked by Host Plant Factors . **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 611–628, 2013.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–9, 2017.

KRUASUWAN, W.; THAMCHAIPENET, A. Diversity of Culturable Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes Associated with Sugarcane Roots and Their Effect of Growth by Co-Inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 4, p. 1074–1087, 2016.

KUMAR, A.; DUBEY, A. Rhizosphere microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 337–352, 2020.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

KURZ, W. G. W.; LARUE, T. A. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. **Nature**, v. 256, n. 5516, p. 407–409, 1975.

KUYKENDALL, L. D. et al. Genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum Jordan 1982 and a proposal for Bradyrhizobium elkanii sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 501–505, 1992.

LACEY, J. **Actinomycetales: characteristics and practical importance**. Society for Applied Bacteriology Symposium Series. **Anais...1973**

LANDELL, M. G. DE A. et al. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. In: **Ribeirão Preto: Instituto Agrônomo de Campinas**, [s.l.: s.n.]. p. 17.

LANDELL, M. G. DE A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. **Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônomo**, p. 101–155, 2008.

LEGHARI, S. J. et al. Role of nitrogen for plant growth and development: A review. **Advances in Environmental Biology**, v. 10, n. 9, p. 209–219, 2016.

LI, C. et al. Change in deep soil microbial communities due to long-term fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 264–272, 2014.

LI, F. et al. Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2017.

LI, R. et al. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in sugarcane fields applied with organic fertilizer. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 165–170, 1987.
- LOUWS, F. J. et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2286–2295, 1994.
- LUNDBERG, D. S. et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86–90, 2012.
- LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525–4529, 1992.
- MADHAIYAN, M. et al. *Bacillus rhizosphaerae* sp. nov., an novel diazotrophic bacterium isolated from sugarcane rhizosphere soil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 437–444, 2011.
- MAGALHAES, F. M. et al. New acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais-Academia Brasileira de Ciencias**, 1983.
- MAGNANI, G. S. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250–258, 2010.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. [s.l.] Princeton university press, 1988.
- MAILLARD, A. et al. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. MAY, p. 1–15, 2015.
- MARAFON, A. C. Análise quantitativa de crescimento em Cana-de-açúcar: Uma introducao ao procedimento práctico. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, v. 168, n. 1, p. 31, 2012.
- MARCELLETTI, S.; FERRANTE, P.; SCORTICHINI, M. Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. **Diversity**, v. 2, n. 11, p. 1205–1222, 2010.
- MARTIN, B. et al. conserved repeated DNA. v. 20, n. 13, p. 3479–3483, 1992.
- MARTINS, M. T. B. et al. Characterization of sugarcane (*Saccharum* spp.) leaf senescence: Implications for biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2016.
- MASSON-BOIVIN, C. et al. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 458–466, 2009.
- MATOS, G. F. DE. **Caracterização de novos rizóbios isolados de raízes de cana-de-açúcar**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2017.
- MATSUBARA, M.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D. Phenotypic and molecular differences among rhizobia that nodulate *Phaseolus lunatus* in the Supe valley in Peru. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1803–1808, 2015.
- MATTHEWS, S. S. **The response of wheat to inoculation with the diazotroph *Azorhizobium caulinodans***. University of Nottingham, , 2001.

- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- MEENA, K. K. et al. Mitigation of Salinity Stress in Wheat Seedlings Due to the Application of Phytohormone-Rich Culture Filtrate Extract of Methylophilic Actinobacterium *Nocardioideus* sp. NIMMe6. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. September, p. 1–16, 2020.
- MENNA, P. et al. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1–3, p. 120–130, 2009.
- MOLOUBA, F. et al. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3084–3094, 1999.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. **Editora UFLA**, v. ed. 2, p. 729, 2006.
- MOZEN, M. M.; BURRIS, R. H. The incorporation of ¹⁵N-labelled nitrous oxide by nitrogen fixing agents. **Biochimica et biophysica acta**, v. 14, n. 4, p. 577–578, 1954.
- NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. 2000.
- NIINEMETS, U. Growth of young trees of *Acer platanoides* and *Quercus robur* along a gap understory continuum: Interrelationships between allometry, biomass partitioning, nitrogen, and shade tolerance. **International Journal of Plant Sciences**, v. 159, n. 2, p. 318–330, 1998.
- NOGUEIRA, A. R. DE A. et al. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. [s.l.] EMBRAPA-CPPSE, 1998.
- NOISANGIAM, R. et al. Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of bradyrhizobium strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6236–6250, 2012.
- NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume bacteriology Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops. 1976.
- NOUWEN, N. et al. The role of rhizobial (NifV) and plant (FEN1) homocitrate synthases in *Aeschynomene*/photosynthetic *Bradyrhizobium* symbiosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- NUNES JUNIOR, D. et al. Indicadores agrícolas do setor canavieiro: safra 2003/2004. **Ribeirão Preto: Idea**, 2005.
- OKAZAKI, S. et al. Genome analysis of a novel bradyrhizobium sp. *doa9* carrying a symbiotic plasmid. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.
- OKUBO, T. et al. Complete genome sequence of bradyrhizobium sp. S23321: Insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 3, p. 306–315, 2012.
- OKUBO, T. et al. Origin and evolution of nitrogen fixation genes on symbiosis Islands and plasmid in *Bradyrhizobium*. **Microbes and Environments**, v. 31, n. 3, p. 260–267, 2016.

- OLDROYD, G. E. D. et al. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 119–144, 2011.
- OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2013.
- OLIVEIRA, A. L. M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106–113, 2009.
- OO, K. T. et al. Isolation , Screening and Molecular Characterization of Multifunctional Plant Growth Promoting Rhizobacteria for a Sustainable Agriculture. p. 773–792, 2020.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. A genomotaxonomy view of the bradyrhizobium genus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, p. 1–13, 2019.
- OVERBEEK, R. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 206–214, 2014.
- PAGAN, J. D. et al. Nitrogen fixation by Rhizobium cultured on a defined medium. **Nature**, v. 256, n. 5516, p. 406–407, 1975.
- PALANIYANDI, S. A. et al. Streptomyces sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of “Micro Tom” tomato plants. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 766–773, 2014.
- PARK, S. E. et al. A legume rotation crop lessens the need for nitrogen fertiliser throughout the sugarcane cropping cycle. **Field Crops Research**, v. 119, n. 2–3, p. 331–341, 2010.
- PAUNGFOO-LONHIENNE, C. et al. Legume crop rotation suppressed nitrifying microbial community in a sugarcane cropping soil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.
- PENG, S. et al. Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 94, n. 4, p. 925–929, 2002.
- PEREIRA, L. B. et al. Responses of the sugarcane rhizosphere microbiota to different levels of water stress. **Applied Soil Ecology**, v. 159, n. October, p. 103817, 2021.
- PEREIRA, W. et al. Nitrogen acquisition and ¹⁵N-fertiliser recovery efficiency of sugarcane cultivar RB92579 inoculated with five diazotrophs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 0123456789, 2020.
- PIROMYOU, P. et al. Preferential association of endophytic bradyrhizobia with different rice cultivars and its implications for rice endophyte evolution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 9, p. 3049–3061, 2015.
- PIROMYOU, P. et al. Potential of rice stubble as a reservoir of bradyrhizobial inoculum in rice-legume crop rotation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 22, 1 nov. 2017.
- PRAUSER, H. of the Order Actinomycetales. **Cultures**, p. 58–65, 1976.
- RADEMAKER, J.; BRUIJN, F. **Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis DNA markers: protocols, applications and ...**, 1997.
- RATÓN, T. DE LOS M. O. et al. Isolation and characterisation of aerobic endospore forming

Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1593–1603, 2012.

REBOUÇAS, E. DE L. et al. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 143–154, 2013.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: Bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435–443, 2011.

REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2155–2162, 2004.

REIS, V. M. et al. Agronomic performance of sugarcane inoculated with *Nitrospirillum amazonense* (BR11145). **Revista Caatinga**, v. 33, n. 4, p. 918–926, 2020.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR 11281, *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR 11335, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, BR 11504; *Azosp.* **Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica**, 2009.

REZENE, Y. et al. Rep-PCR Genomic Fingerprinting Revealed Genetic Diversity and Population Structure among Ethiopian Isolates of *Pseudocercospora griseola* Pathogen of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 9, n. 11, 2018.

RILLING, J. I. et al. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 130, n. December 2018, p. 205–219, 2019.

RIO, D. C. et al. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 5, n. 6, p. 1–4, 2010.

RIVAS, R. et al. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1271–1275, 2004.

ROBERTSON, G. P.; VITOUSEK, P. M. Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, n. 1, p. 97–125, 2009.

RODRIGUES COELHO, M. R. et al. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 1, p. 15–22, 2008.

RODRIGUES NETO, J. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathol**, v. 12, p. 16, 1986.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4–5, p. 319–339, 1999.

ROESCH, L. F. W. et al. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v. 302, n. 1–2, p. 91–104, 2008.

- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- ROSSELLÓ-MÓRA, R. Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 318–334, 2012.
- ROUWS, L. F. M. et al. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 3, p. 325–330, 2010.
- ROUWS, L. F. M. et al. Endophytic Bradyrhizobium spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 4, p. 354–363, 2014.
- RUSCHEL, A. P.; HENIS, Y.; SALATI, E. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugarcane seedlings. **Soil Biology+ Biochemistry**, 1975.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SALEH, S. A. et al. Survival of Azorhizobium and Azospirillum in different carrier materials: inoculation of wheat and Sesbania rostrata. **BULLETIN-FACULTY OF AGRICULTURE UNIVERSITY OF CAIRO**, v. 52, n. 2, p. 319–338, 2001.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.
- SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92–99, 2016.
- SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 163–174, 1996.
- SCHÖLLHORN, R.; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, n. 1, p. 213–216, 1967.
- SCHULTZ, N. et al. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 261–268, 2012.
- SCHULTZ, N. et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407–414, 2014.
- SCHULTZ, N. et al. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016.
- SCHULTZ, N. et al. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 366–374, 2 out. 2017.
- SCIVITTARO, W. B. et al. Utilização de nitrogênio de adubos verde e mineral pelo milho.

Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 24, n. 4, p. 917–926, 2000.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6503–6508, 1990.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Functional Plant Biology**, v. 13, n. 6, p. 699–756, 1986.

SHOKO, M. D.; ZHOU, M. Nematode diversity in a soybean-sugarcane production system in a semi-arid region of Zimbabwe. v. 1, n. 2, p. 25–28, 2009.

SIMONSSON, M. et al. Potassium release and fixation as a function of fertilizer application rate and soil parent material. v. 140, p. 188–198, 2007.

SINCLAIR, T. R. et al. Sugarcane leaf area development under field conditions in Florida, USA. v. 88, p. 171–178, 2004.

SINGH, R. K. et al. Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: A comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–21, 2020.

SMERCINA, D. N. et al. Erratum for Smercina et al., “To Fix or Not To Fix: Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere”. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 22, p. 1–15, 2019.

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2- 3 SPEC. ISS., p. 169–183, 2005.

SOARES, M. B. B. et al. Comunidade infestante e área de reforma de cana crua submetida a diferentes manejos. **Planta Daninha**, v. 34, n. 1, p. 91–98, 2016.

SOARES, M. B. B. et al. Phytosociological study on the weed communities in green sugarcane field reform using conservation tillage and oilseed crops in succession. **Applied ecology and environmental research**, v. 15, n. 3, p. 417–428, 2017.

SOLANKI, M. K. et al. Rhizospheric and endospheric diazotrophs mediated soil fertility intensification in sugarcane-legume intercropping systems. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 4, p. 1911–1927, 2019.

SOLANKI, M. K. et al. Impact of Sugarcane–Legume Intercropping on Diazotrophic Microbiome. **Sugar Tech**, v. 22, n. 1, p. 52–64, 2020.

SORENSEN, S. R.; JUHLER, R. K.; AAMAND, J. Degradation and mineralisation of diuron by *Sphingomonas* sp. SRS2 and its potential for remediating at a realistic $\mu\text{g L}^{-1}$ diuron concentration. **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1239–1244, 2013.

SPATZAL, T. The center of biological nitrogen fixation: FeMo-cofactor. **Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie**, v. 641, n. 1, p. 10–17, 2015.

STĘPKOWSKI, T. et al. European origin of bradyrhizobium populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7041–7052, nov. 2005.

SUN, J.-G. et al. Isolation, identification and inoculation effect of nitrogen-fixing bacteria

Sphingomonas GD542 from maize rhizosphere. **Chinese Journal of Eco-Agriculture**, v. 18, n. 1, p. 89–93, 19 jan. 2010.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l.] Artmed Editora, 2017.

TAKAHASHI, Y.; TOKUMOTO, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in Archaea and plastids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 32, p. 28380–28383, 2002.

TEAM, R. C. **R: a language and environment for statistical computing, version 3.0. 2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013**, 2019.

TERAKADO-TONOOKA, J.; FUJIHARA, S.; OHWAKI, Y. Possible contribution of Bradyrhizobium on nitrogen fixation in sweet potatoes. **Plant and Soil**, v. 367, n. 1–2, p. 639–650, 2013.

TEULET, A. et al. Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of NOD and T3SS genes in the genus bradyrhizobium. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 9, p. 1–18, 2020.

THAWEENUT, N. et al. Two seasons' study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (Saccharum spp. hybrids): Expression of nifH genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, n. 1, p. 435–449, 2011.

TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249–266, 2010.

UNKOVICH, M. et al. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. [s.l.] Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2008.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 1–12, 2012.

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 2012a.

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 2012b.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105–114, 1992.

VAN BERKUM, P. et al. Discordant phylogenies within the rrn loci of Rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 2988–2998, 2003.

VANINSBERGHE, D. et al. Non-symbiotic Bradyrhizobium ecotypes dominate North American forest soils. **ISME Journal**, v. 9, n. 11, p. 2435–2441, 2015.

VERSALOVIC, J. et al. Institute for Molecular Genetics and department of Pediatrics , Baylor College of Medicine ,. **Cell**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 1, p. 25–40, 1994.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria - J. M. Vincent - Google Livros**. [s.l.: s.n.].

VINUESA, P. et al. 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 Brady. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 569–575, 2005.

VITORINO, L. C.; BESSA, L. A. Microbial diversity: The gap between the estimated and the known. **Diversity**, v. 10, n. 2, 2018.

WACHOWSKA, U. et al. Biological control of winter wheat pathogens with the use of antagonistic Sphingomonas bacteria under greenhouse conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 10, p. 1110–1122, 2013.

WANG, Y. et al. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant, Cell & Environment**, v. 16, n. 5, p. 579–585, 1993.

WANG, Z. et al. Draft genome analysis offers insights into the mechanism by which Streptomyces chartreusis WZS021 increases drought tolerance in sugarcane. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–14, 2019.

WANG, Z. et al. Diversity of sugarcane root-associated endophytic Bacillus and their activities in enhancing plant growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 814–827, 2020.

WARDLE, D. A. et al. Response of soil microbial biomass dynamics, activity and plant litter decomposition to agricultural intensification over a seven-year period. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 12, p. 1707–1720, 1999.

WDOWIAK, S.; MAŁEK, W. Numerical Analysis of Astragalus cicer Microsymbionts. v. 41, p. 142–148, 2000.

WHITE, P. J. **Long-distance Transport in the Xylem and Phloem**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2011.

WICKHAM, H. et al. Ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics (2018). URL <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>. **R package version**, v. 2, n. 1, p. 2, 2019.

WILLEMS, A. et al. In most Bradyrhizobium groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 203–210, 2003.

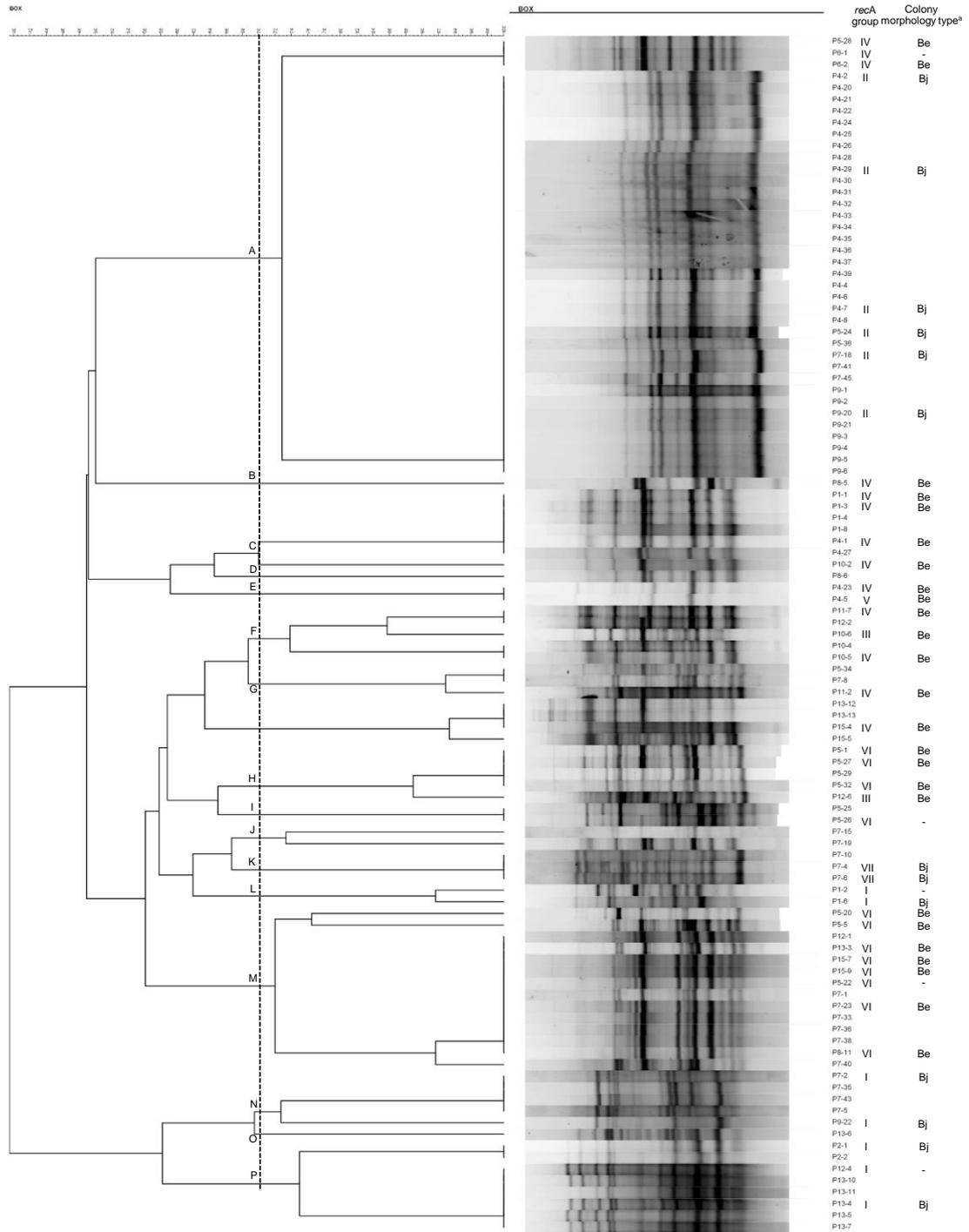
WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: An overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1–2, p. 3–14, 2006.

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization

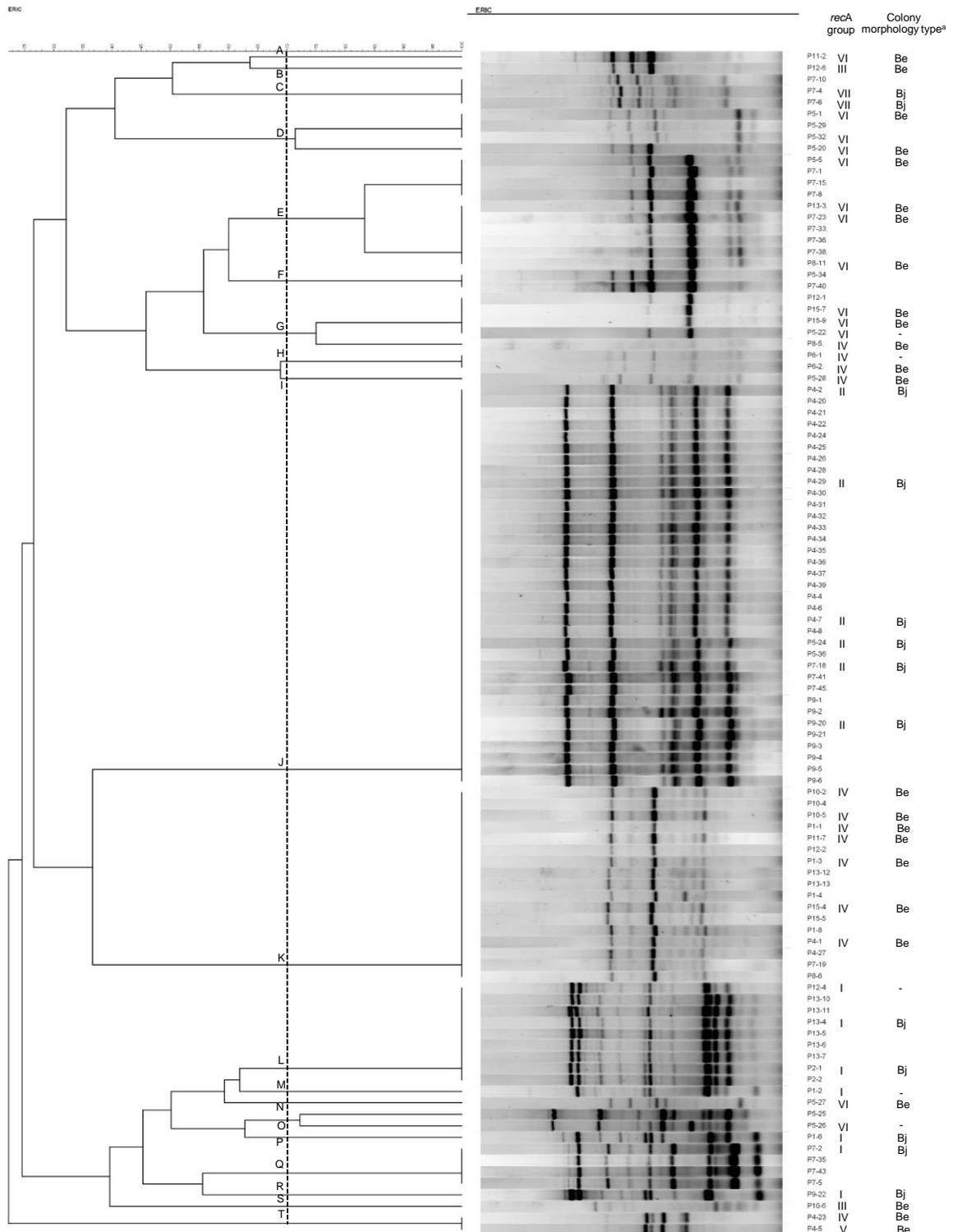
- analyses of Bradyrhizobium species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 111–117, 2001.
- WILLMS, I. M. et al. Globally Abundant “ Candidatus Udaeobacter” Benefits from Release of Antibiotics in Soil and Potentially Performs Trace Gas Scavenging . **mSphere**, v. 5, n. 4, p. 1–17, 2020.
- WONGDEE, J. et al. NifDK clusters located on the chromosome and megaplasmid of bradyrhizobium sp. Strain DOA9 contribute differently to nitrogenase activity during symbiosis and free-living growth. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 10, p. 767–773, 2016.
- WOODS, C. R. et al. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1927–1931, 1993.
- XIE, C. H.; YOKOTA, A. Sphingomonas azotifigens sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of Oryza sativa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 889–893, 2006.
- XU, L. M. et al. Bradyrhizobium liaoningense sp. nov., Isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 706–711, 1995.
- YANNI, Y. G. et al. Natural endophytic association between Rhizobium leguminosarum bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, n. 1–2, p. 99–114, 1997.
- YAO, Z. Y. et al. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus Lespedeza and description of Bradyrhizobium yuanmingense sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2219–2230, 2002.
- YONEYAMA, T. et al. Molecular Analyses of the Distribution and Function of Diazotrophic Rhizobia and Methanotrophs in the Tissues and Rhizosphere of Non-Leguminous Plants. **Plants**, v. 8, n. 10, p. 408, 2019.
- YOON, V. et al. Colonization efficiency of different sorghum genotypes by Gluconacetobacter diazotrophicus. **Plant and Soil**, v. 398, n. 1–2, p. 243–256, 2016.
- ZAKHIA, F.; DE LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. 2001.
- ZHANG, F. et al. Potassium nutrition of crops under varied regimes of nitrogen supply. **Plant and Soil**, v. 335, n. 1, p. 21–34, 2 mar. 2010.
- ZHAO, Q. et al. Comparative genomic analysis of 26 Sphingomonas and Sphingobium strains: Dissemination of bioremediation capabilities, biodegradation potential and horizontal gene transfer. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1238–1247, 2017.
- ZILLI, J. É. et al. Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 153–160, 2013.

9. ANEXOS

Anexo 1. Dendrograma de similaridade (UPGMA) genética por padrões BOX-PCR de *Bradyrhizobium* spp. obtidos de raízes de cana-de-açúcar. Grupos formados de A-S representam uma linha de corte a 70% de similaridade. Tipos de *recA* de I-VII foi gerado pela análise filogenética de genes representantes dos grupos (Figura 3). Tipo de morfologia de colônia foi obtida por caracterização de acordo com a figura 1.



Anexo 2. Dendrograma de similaridade (UPGMA) genética por padrões ERIC-PCR de *Bradyrhizobium* spp. obtidos de raízes de cana-de-açúcar. Grupos formados de A-S representam uma linha de corte a 70% de similaridade. Tipos de *recA* de I-VII foi gerado pela análise filogenética de genes representantes dos grupos (Figura 3). Tipo de morfologia de colônia foi obtida por caracterização de acordo com a figura 1.



Anexo 3. Numero de acesso de sequencias de genes *recA* e indicação da posição da sequencias entre os grupos colapsados na arvore filogenética.

Estirpe	Número de Acesso <i>recA</i>	Grupo colapsado
<i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1	KM378397	A
<i>Bradyrhizobium nitroreducens</i> TSA1	LFJC01000003	A
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i> EK0T	LM994319	A
<i>Bradyrhizobium ingae</i> BR 10250	KF927061	A
<i>Bradyrhizobium americanum</i> CMVU44	KC247141	A
<i>Bradyrhizobium cajani</i> 1010	WQNE01000028	A
<i>Bradyrhizobium centrolobii</i> BR 10245	NZ_LUUB00000000	A
<i>Bradyrhizobium daqingense</i> CGMCC 1.10947	NZ_VLKL01000002	A
<i>Bradyrhizobium forestalis</i> INPA54B	NZ_PGVG00000000	A
<i>Bradyrhizobium frederickii</i> CNPS0 3426	SPQS01000004	A
<i>B. huanghuaihaiense</i> CGMCC 1.10948	NZ_VLLA00000000	A
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> CCBAU 05525	AJQC00000000	A
<i>Bradyrhizobium neotropicale</i> BR 10247	LSEF00000000	A
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99	NZ_CP029425	A
<i>Bradyrhizobium shewense</i> ERR11	FMAI00000000	A
<i>Bradyrhizobium vignae</i> LMG 28791	PRJNA497496	A
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> BR3267	NZ_LJYF01000050	A
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 05623	NZ_AJQJ00000000	A
<i>Bradyrhizobium zhanjiangense</i> CCBAU 51787	NZ_LBJM00000000	A
<i>Bradyrhizobium rifense</i> CTAW71	VSSS01000017	B
<i>Bradyrhizobium amphicarphaeae</i> 39S1MB	NZ_CP029426	B
<i>Bradyrhizobium betae</i> PL7HG1	CP044543	B
<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA051	NAEY00000000	B
<i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11	NZ_VSSR00000000	B
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110	NZ_CP011360	B
<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i> strain RITF807	JX277145.1	B
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	NC_017249	B
<i>Bradyrhizobium nifitali</i> CNPS0 3448	MK675797.1	B
<i>Bradyrhizobium symbiodeficiens</i> 3 85S1MB	NZ_CP029427	B
<i>Bradyrhizobium archetypum</i> WSM 1744	NZ_JAAVLW010000002	C
<i>Bradyrhizobium australiense</i> WSM 1791	NZ_JAAVLX010000002	C
<i>Bradyrhizobium murdochii</i> WSM1741	NZ_AXAU01000016	C
<i>Bradyrhizobium algeriense</i> RST91	NZ_PYCN00000000	C
<i>Bradyrhizobium icense</i> LMTR 13	NZ_CP016428	C
<i>Bradyrhizobium jicamae</i> PAC68	NZ_LLXZ00000000	C
<i>Bradyrhizobium lablabi</i> MT34	NZ_LT670845	C
<i>Bradyrhizobium namibiense</i> 5-10	KM378377.1	C
<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i> LMTR 21	MAXB00000000	C
<i>Bradyrhizobium retamae</i> Ro19	LLYA00000000	C
<i>Bradyrhizobium valentinum</i> LmjM3	JX518589.2	C
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	EU665419.1	D
<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> S58	NC_020453	D
<i>Bradyrhizobium guangzhouense</i> CCBAU 51670	CP030053	
<i>Bradyrhizobium arachidis</i> LMG 26795	NZ_FPBQ00000000	
<i>Bradyrhizobium brasilense</i> UFLA 03-321	NZ_MPVQ01000049.1	
<i>Bradyrhizobium centrosematis</i> A9	KC247145.1	
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	KB900701.1	
<i>Bradyrhizobium embrapense</i> SEMIA 6208	NZ_LFIP00000000	
<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> MT12	FNTH00000000	
<i>Bradyrhizobium ferriligni</i> CCBAU 51502	KJ818112.1	
<i>Bradyrhizobium guangdongense</i> CCBAU 51649	NZ_CP030051	
<i>Bradyrhizobium guangxiense</i> CCBAU 53363	NZ_CP022219	
<i>Bradyrhizobium ivorense</i> CI-1B	CAADFC020000009	
<i>Bradyrhizobium ivorense</i> CI-41S	PRJEB30881	
<i>Bradyrhizobium kavangense</i> 14-3	KM378399.1	
<i>Bradyrhizobium macuxiense</i> BR 10303	LNCU00000000	
<i>Bradyrhizobium mercantei</i> SEMIA 6399	NZ_MKFI01000009	
<i>Bradyrhizobium nanningense</i> CCBAU 53390	LBJC00000000	
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> BR3262	NZ_LJYE01000083	
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> PAC 48	SAMN03782120	
<i>Bradyrhizobium ripae</i> WR4	MF593090.1	
<i>Bradyrhizobium sacchari</i> P9-20	LWIG00000000	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UFLA03-84	NSJY01000017	
<i>Bradyrhizobium stylosanthis</i> BR 446	NZ_LVEM00000000	
<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> SEMIA 6148	NZ_LFLZ00000000	
<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> SEMIA 690	NZ_LGTB00000000	

Anexo 4. Informações do genoma de todas as cepas de *Bradyrhizobium* usadas neste estudo.

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
FPBQ00000000	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> LMG 26795 ^T	104	9792874	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	B
AXAD00000000	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> USDA 3384	53	9799191	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	B
MZXW00000000	<i>Bradyrhizobium betae</i> Opo-243	57	8630250	63,8	<i>B. japonicum</i> *	não	-
NAEX00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA050	188	8299015	60,9	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAEY00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA051	173	8273379	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAEZ00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA052	182	8294491	62,5	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFA00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA060	204	8291234	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFB00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA061	196	8267021	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFC00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA122	177	8214782	63,1	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFD00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA171	195	8279565	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFE00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA181	227	8299676	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFF00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA182	114	8216640	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFG00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA183	183	8288770	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFH00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA192	180	8287509	62,9	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFI00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA195	190	8274608	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFJ00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMA510	159	8367860	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NAFK00000000	<i>Bradyrhizobium canariense</i> UBMAN05	178	8376411	63	<i>B. japonicum</i>	sim	F
LUUB00000000	<i>Bradyrhizobium centrolonii</i> BR 10245 ^T	235	10106900	63,2	<i>B. japonicum</i>	sim	-
CP032617	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> 110spc4	1	8910608	64,1	<i>B. japonicum</i> *	sim	A

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
AJQI00000000	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> CCBAU 41267	563	9121826	64	<i>B. japonicum</i>	sim	A
LGUJ00000000	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> Is-1	107	8983376	64	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AP014685	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> NK6	1	9780023	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	A
NC_004463	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	1	9105828	64,1	<i>B. japonicum</i>	sim	A
CP013127	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 122	1	9136536	64	<i>B. japonicum</i>	sim	A
CP029603	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> XF7	1	9269701	63,9	<i>B. japonicum</i> *	sim	A
NWTE00000000	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> Y21	132	8941773	64	<i>B. japonicum</i>	sim	A
PSRT00000000	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. SA-3 Rp7b	388	8722424	63,2	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
AXBC01	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. SA-4 str. CB756	12	9825971	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	B
CP030051	<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	1	7456045	63,8	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
CP030052	<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T plasmid	1	981946	59,3	-	não	-
CP022219	<i>Bradyrhizobium guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	1	7220948	64,5	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
CP022220	<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T plasmid p53363	1	979173	59,3	-	sim	-
VLLA00000000	<i>B. huanghuaihaiense</i> CGMCC 1.10948	106	9224411	63,9	<i>B. japonicum</i> *	sim	A
AXVG00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 22	30	7476851	64,5	<i>B. japonicum</i>	sim	-
AJPX00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU 15354	951	10126594	63,3	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJPY00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU 15517	1129	9917031	63,4	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJPZ00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU 15618	691	9824012	63,4	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJQA00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU 25435	520	9460795	63,5	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJQB00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU 83623	1212	10074298	63,3	<i>B. japonicum</i> *	sim	A
CP010313	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	1	9224208	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	A
JGCL00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> FN1	104	9138022	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	A

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
AUGD00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> in8p8	53	7589900	63,8	<i>B. japonicum</i>	não	-
JRPN00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> Is-34	260	10326009	63	<i>B. japonicum</i>	sim	A
ATWP00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> is5	60	7588794	63,8	<i>B. japonicum</i>	não	-
CP017637	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> J5	1	10138651	63,3	<i>B. japonicum</i>	sim	A
CP007569	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079	10	9582116	63,5	<i>B. japonicum</i>	sim	A
NAFL00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> UBMA197	287	10442239	63,3	<i>B. japonicum</i>	sim	F
AXVP00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 123	518	10457590	63,3	<i>B. japonicum</i>	sim	A
ARFJ00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 124	141	9000014	64	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AXAT00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 135	548	7702822	64	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AXAG00000000	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 38	109	9608457	63,5	<i>B. japonicum</i>	sim	A
NC_017249	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 ^T	1	9207384	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJQC00000000	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> CCBAU 05525	1040	8164124	63,8	<i>B. japonicum</i> *	sim	A
AJQD00000000	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> CCBAU 83689	1133	8009819	63,8	<i>B. japonicum</i> *	sim	A
LUKO00000000	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> CCNWSX0360	242	8590559	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	-
LSEF00000000	<i>Bradyrhizobium neotropicale</i> BR 10247 ^T	203	8676609	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	-
NWTF00000000	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> L2	167	8797357	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	-
NZ_CP029425	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99 ^T	1	8606328	63,8	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AXAF00000000	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> USDA 4	99	8737101	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	A
LWIG00000000	<i>Bradyrhizobium sacchari</i> BR 10280 ^T	351	8685964	63,8	<i>B. japonicum</i>	sim	-
FMAI00000000	<i>Bradyrhizobium shewense</i> ERR11 ^T	107	9162066	63,2	<i>B. japonicum</i>	sim	B
CP029426	<i>Bradyrhizobium</i> sp. 2 39S1MB	1	7044517	64,7	<i>B. japonicum</i>	sim	-
CP041090	<i>Bradyrhizobium</i> sp. 3 65S1MB	1	7132395	64,3	<i>B. japonicum</i> *	não	-
CP029427	<i>Bradyrhizobium</i> sp. 3 85S1MB	1	7039503	64,3	<i>B. japonicum</i>	não	-

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
PTFE00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AC87j1	307	8683180	63,7	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
JACOFQ000000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AG48	71	7561022	63,65	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
LGHM01	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AS23.2	430	8705449	63,1	<i>B. japonicum</i>	sim	D
JXDL00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AT1	267	7351294	64,2	<i>B. japonicum</i>	sim	-
LN901633	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BF49	1	7547693	63,8	<i>B. japonicum</i>	não	-
SGXS00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BK707	22	8011427	64,6	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
SMCG00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BM-T	40	8045545	64,1	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
AJQF00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 15544	612	8484383	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJQG00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 15615	453	8852539	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJQH00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 15635	456	8288715	63,8	<i>B. japonicum</i>	sim	A
AJQE00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 43298	508	7916986	63,9	<i>B. japonicum</i>	sim	A
LBJQ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 51757	109	8221464	63,4	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
RKMK00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 51770	175	8664840	63,1	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
CP022221	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 51778	1	9342022	62,9	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
RDRA00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 51781	97	8230389	63,4	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
LBJM00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 51787	261	8586959	63,2	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
LBJC00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 53390	85	8290003	63,4	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
RDQY00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 53424	101	8281569	63,4	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
RDQZ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 53426	108	8015844	63	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
CP013949	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCGE-LA001	1	7833499	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	D
LSIC00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCH5-F6	222	8163151	64,1	<i>B. japonicum</i>	sim	-
FOQJ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. cf659	26	8464388	64,5	<i>B. japonicum</i>	sim	-
SPQU00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 3424	144	8325748	63,9	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
SPQS00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 3426	145	8294086	63,8	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
SPQT00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 3448	144	9787683	63,5	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
AUFA00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Cp5.3	150	8915986	63,4	<i>B. japonicum</i>	sim*	-

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
JXJM00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA1	204	7425195	63,6	<i>B. japonicum</i>	sim	-
DF820425	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9	5	7100464	64,5	<i>B. japonicum</i>	sim	-
DF820426	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9 plasmid pDOA9	1	736085	60,1	-	sim	-
JXJM00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Ec3.3	163	10032596	62,6	<i>B. japonicum</i>	sim*	-
CZWJ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. G22	9	9009710	63,7	<i>B. japonicum</i>	não	-
FOQM00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Gha	97	8252430	62,9	<i>B. japonicum</i>	sim	-
FOVU00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Ghvi	44	7924049	63	<i>B. japonicum</i>	sim	B
PGVG00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. INPA54B ^T	189	8251436	63,9	<i>B. japonicum</i>	sim	B
LMQJ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Leaf396	67	7709230	63,8	<i>B. japonicum</i>	não	-
JYMR00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LTSP849	63	8569896	63,2	<i>B. japonicum</i>	não	-
JYMS00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LTSP857	68	8425432	63,3	<i>B. japonicum</i>	não	-
NZ_QZMV00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LVM 105	99	8326135	63,9	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
JACOFR000000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. M12	53	7755363	64,31	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
PYFX00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MOS002	70	7575111	63,6	<i>B. japonicum</i> *	não	-
PYFW00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MOS003	24	7261081	64,2	<i>B. japonicum</i> *	não	-
LGHL00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. NAS80.1	534	9235464	63,1	<i>B. japonicum</i>	sim	D
LGHK00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. NAS96.2	450	8927485	63,8	<i>B. japonicum</i>	sim	D
FOBX00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. OK095	51	7846124	63,9	<i>B. japonicum</i>	não	-
LS398110	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3257	1	8156021	63,3	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
SMBR00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. R2.2-H	39	8046194	64,1	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
FNCU00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Rc2d	119	9577941	62,8	<i>B. japonicum</i>	sim	-
FOUS00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Rc3b	50	8375310	63,7	<i>B. japonicum</i>	sim	B
RQIT00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RP6	85	7710352	63,8	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
AP012279	<i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321	1	7231841	64,3	<i>B. japonicum</i>	sim	-
LAXE00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SUTN9-2	222	7865114	63,5	<i>B. japonicum</i> *	sim	-

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
AUGA00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. th.b2	275	10114333	63,3	<i>B. japonicum</i>	sim	C
DRA006493	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TM124	31	7114129	64,28	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
LFJC00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TSA1	156	8197857	64,3	<i>B. japonicum</i>	sim	-
JADK00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. URHA0013	25	7191117	63,8	<i>B. japonicum</i>	não	-
SMCM00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. W	42	8048590	64,1	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
AHMB00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1253	71	8712908	63,1	<i>B. japonicum</i>	sim	F
AZXU00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1417	3	8048763	63,2	<i>B. japonicum</i>	sim	-
AXAZ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	168	8340311	63,4	<i>B. japonicum</i>	sim	B
AXAB00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM2254	106	9081938	63,9	<i>B. japonicum</i>	sim	E
ARBF00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM2793	85	8870833	63,5	<i>B. japonicum</i>	sim	-
AXAY00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM3983	75	8785439	63	<i>B. japonicum</i>	sim	E
ARDH00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM4349	110	8292032	63,1	<i>B. japonicum</i> *	sim	F
NZ_CM001442	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM471	2	7783916	63,4	<i>B. japonicum</i>	sim	F
NWTI00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Y36	56	7327521	65	<i>B. japonicum</i>	não	-
SMBQ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Y-H1	41	8045606	64,1	<i>B. japonicum</i> *	sim	-
AKIY00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. YR681	351	7831714	64,7	<i>B. japonicum</i>	não	-
NZ_LVEM00000000	<i>Bradyrhizobium stylosanthis</i> BR 446 ^T	22	8801717	64,6	<i>B. japonicum</i>	sim	-
RDQF00000000	<i>Bradyrhizobium vignae</i> LMG 28791	157	8175599	63,2	<i>B. japonicum</i> *	sim	B
LJYF00000000	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> BR3267	183	7899150	63,9	<i>B. japonicum</i>	sim	-
AJQJ00000000	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 05623	570	8245751	63,8	<i>B. japonicum</i>	sim	-
FMAE00000000	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	109	8201482	63,8	<i>B. japonicum</i>	sim	-
AJQK00000000	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 25021	490	7990949	63,8	<i>B. japonicum</i>	sim	-
AJQL00000000	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 35157	457	7854129	63,9	<i>B. japonicum</i>	sim	-
SATS00000000	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> P10 130	65	7541929	64,2	<i>B. japonicum</i> *	sim	D

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
AP012603	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> S58 ^T	1	8264165	65,1	Photosyntheti c	sim	-
CP000494	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	1	8264687	64,8	Photosyntheti c	sim	-
CP000495	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 plasmid pBBta01	1	228826	60,7	-	não	-
CU234118	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	1	7456587	65,5	Photosyntheti c	sim	-
CAFH00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 285	1	7797098	65,2	Photosyntheti c	sim	-
CAFI00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 375	500	7859448	65,5	Photosyntheti c	sim*	-
CAFJ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. STM 3809	807	7311728	66,2	Photosyntheti c	sim*	-
CAFK00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. STM 3843	359	8434733	63,6	Photosyntheti c	sim*	-
DRA006492	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TM122	29	7937094	64,79	Photosyntheti c*	sim	-
AJK00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> 587	2430	8673157	63,6	<i>B. elkanii</i>	sim*	-
LWUI00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> BLY3-8	92	9198784	63,8	<i>B. elkanii</i>	sim	C
LXEM00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> BLY6-1	82	9202267	63,8	<i>B. elkanii</i>	sim	C
SEMA00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> BR29	48	9196354	63,8	<i>B. elkanii</i> *	sim	C
AJPV00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> CCBAU 05737	751	9773178	63,5	<i>B. elkanii</i>	sim	C
AJPW00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> CCBAU 43297	654	9347700	63,7	<i>B. elkanii</i>	sim	C
SZZP00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> Semia 938	80	8780064	63,9	<i>B. elkanii</i> *	sim	C
MOXO00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> TnphoA33	1004	9529476	63,7	<i>B. elkanii</i>	sim*	-
JXOF00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> UASWS1015	187	7820754	64,6	<i>B. elkanii</i>	não	-
AXAH00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 3254	89	8978029	63,4	<i>B. elkanii</i>	sim	C
AXAW00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 3259	102	8722236	63,9	<i>B. elkanii</i>	sim	C
NZ_ARAG00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76 ^T	27	9482457	63,7	<i>B. elkanii</i>	sim	C
JAFC00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 94	234	9553449	63,7	<i>B. elkanii</i>	sim	C
AXAP00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> WSM2783	218	9901641	62,4	<i>B. elkanii</i>	sim*	-
SAMN03782074	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> SEMIA 6208 ^T	36	8267832	64	<i>B. elkanii</i>	sim	C

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
FNTH00000000	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> MT12	2	8967172	61,4	<i>B. elkanii</i>	não	-
LNCU00000000	<i>Bradyrhizobium macuxiense</i> BR 10303 ^T	308	8715501	63,2	<i>B. elkanii</i>	sim	D
LJYG00000000	<i>Bradyrhizobium manausense</i> BR3351 ^T	421	9133895	62,9	<i>B. elkanii</i>	sim*	-
NZ_MKFI01000009	<i>Bradyrhizobium mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	72	8842857	64	<i>B. elkanii</i>	sim	D
LJYE00000000	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> BR3262	380	8955493	63,7	<i>B. elkanii</i>	sim	C
SAMN03782120	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	648	8706184	63,8	<i>B. elkanii</i>	sim	C
AUEZ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Ai1a-2	250	9027241	63,7	<i>B. elkanii</i>	sim*	-
NWTG00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. C9	75	8428389	64,1	<i>B. elkanii</i>	sim	C
CAADFB00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CI-41S	59	8864324	64,4	<i>B. elkanii</i> *	sim	C
AMFB00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DFCI-1	98	7645871	64,4	<i>B. elkanii</i>	não	-
PSRS00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Leo121	648	9749579	63,3	<i>B. elkanii</i>	sim	E
PSRR00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Leo170	1001	9473874	63,6	<i>B. elkanii</i>	sim	E
JYMT00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LTSP885	63	7850547	63,4	<i>B. elkanii</i>	não	-
JYMU00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LTSPM299	104	9094179	62,8	<i>B. elkanii</i>	não	-
PYFV00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MOS004	66	7574276	64,5	<i>B. elkanii</i> *	não	-
APJD00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. OHSU_III	82	7935543	64,7	<i>B. elkanii</i>	não	-
NKIX00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. PARBB1	259	7722134	64,5	<i>B. elkanii</i>	não	-
FMZW00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. R5	128	9443614	63,6	<i>B. elkanii</i>	sim	C
CP025113	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SK17	1	8003090	64,6	<i>B. elkanii</i>	não	-
CP025114	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SK17 plasmid unnamed	1	285478	60,8	-	não	-
MPVQ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. UFLA 03-321 ^T	94	8595048	63,9	<i>B. elkanii</i>	sim	C
NSJY00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. UFLA03-84	21	8628932	64,1	<i>B. elkanii</i> *	sim*	-
LFLZ00000000	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	189	9767314	63,5	<i>B. elkanii</i>	sim	C
NZ_LGTB01000152	<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	152	8811922	64	<i>B. elkanii</i>	sim	C

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
PYCM00000000	<i>Bradyrhizobium algeriense</i> RST89 ^T	2911	8636179	60,8	<i>B. jicamae</i> *	sim	E
PYCN01000000	<i>Bradyrhizobium algeriense</i> RST91	337	8907972	62,2	<i>B. jicamae</i> *	sim	E
AXAU00000000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> WSM1741	71	7952267	62,1	<i>B. jicamae</i>	sim*	-
LT670849	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> GAS401	1	7525117	61,2	<i>B. jicamae</i> *	não	-
FSRD00000000	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> GAS478	4	11738562	61,4	<i>B. jicamae</i>	não	-
CP016428	<i>Bradyrhizobium icense</i> LMTR 13 ^T	1	8322773	62	<i>B. jicamae</i>	sim*	-
LLXZ00000000	<i>Bradyrhizobium jicamae</i> PAC68 ^T	456	8714978	62,4	<i>B. jicamae</i>	sim	-
LLYB00000000	<i>Bradyrhizobium lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	416	8798079	62,6	<i>B. jicamae</i>	sim	E
FNTI00000000	<i>Bradyrhizobium lablabi</i> GAS522	2	8269569	62,3	<i>B. jicamae</i>	não	-
LT670845	<i>Bradyrhizobium lablabi</i> MT34	1	8150868	62,3	<i>B. jicamae</i>	não	-
LT629693	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> GAS524	1	8339115	62,3	<i>B. jicamae</i>	não	-
MAXB00000000	<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	146	8290608	62,5	<i>B. jicamae</i>	sim	E
LLYA00000000	<i>Bradyrhizobium retamae</i> Ro19 ^T	235	8466225	61,9	<i>B. jicamae</i>	sim	E
CP042175	<i>Bradyrhizobium</i> sp. KBS0725	43	7319299	62,7	<i>B. jicamae</i> *	não	-
CP042176	<i>Bradyrhizobium</i> sp. KBS0727	26	7315270	62,7	<i>B. jicamae</i> *	não	-
MAXC00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LMTR 3	55	7834745	62,3	<i>B. jicamae</i>	sim	E
AUES00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. URHA0002	146	6972472	62,2	<i>B. jicamae</i>	não	-
LLXX00000000	<i>Bradyrhizobium valentinum</i> LmjM3 ^T	430	8825946	61,9	<i>B. jicamae</i>	sim	E
LLXY00000000	<i>Bradyrhizobium valentinum</i> LmjM6	242	9146476	61,9	<i>B. jicamae</i> *	sim	E
AWZU00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ARR65	139	8613869	62	Kakadu	sim*	-
AXAI00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Tv2a-2	87	8496279	62,2	Kakadu	sim*	-
PGEQ00000000	<i>Bradyrhizobium lablabi</i> GAS165	3	6132387	62,5	Soil 1	não	-
LT629750	<i>Bradyrhizobium canariense</i> GAS369	1	7841944	60,9	Soil 2	não	-
NZ_LT670817	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> GAS138	1	9092036	61,4	Soil 2	não	-

Continuação anexo 4...

Número de acesso	Nome	Num. Cont.	Compimento (bp)	Conteúdo GC	Supergrupo ^a	Genes <i>nifHDK</i>	Super grupo <i>nifH</i>
NZ_LT670818	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> GAS242	1	9184651	61,9	Soil 2	não	-
NZ_LT670844	<i>Bradyrhizobium lablabi</i> GAS499	1	7909999	61,8	Soil 2	não	-
JNIJ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. URHD0069	132	6793222	62,2	Soil 2	não	-
AMQQ00000000	<i>Bradyrhizobium lupini</i> HPC(L)	90	5272243	59,2	none	não	-
LSIN00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCH10-C7	366	5592688	60,7	none	não	-
LSIY00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCH1-B1	243	4299406	67,8	none	não	-
LSIM00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCH4-A6	249	5299950	60,9	none*	não	-
LSJL00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCH5-A9	295	4713629	67,7	none	não	-
FOTP00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. NFR13	17	6226103	61,5	none	não	-
SPVJ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. MOS001	180	9053121	63,6	-	não	-
VAFH00000000	<i>Bradyrhizobium icense</i> S2_003_000_R3_21	2237	4907108	62,5	-	não	-
AUOJ00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. JGI 0001002-A22	67	1961262	61,7	-	não*	-
AXYA00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. JGI 0001019-J21	106	1191681	62,5	-	não*	-
AXYG00000000	<i>Bradyrhizobium</i> sp. JGI 0001019-M21	41	236340	58	-	não*	-

^aAlocação de supergrupos de acordo com as filogenias de máxima verossimilhança de Avontuur et al. (2019). O supergrupo acompanhado de um asterisco foi determinado por análise de MLSA do presente estudo.

- Estirpes não foram incluídas na análise.

sim* - As estirpes mostraram problema no genoma na região do gene *nifH*, *nifD* ou *nifK*.

não* - As estirpes têm sequência de genoma incompleta.

Anexo 5. Relações filogenéticas de cópias concatenadas do gene *nifDK* presentes em estipes de *Bradyrhizobium*. Filograma estimado por *Maximum Likelihood* (ML) a partir de 2825 pb de genes concatenados *nifD* (1471) e *nifK* (1423). Os valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudoreplicados. A árvore ML foi obtida usando o modelo Tamura de 3 parâmetros. A barra de escala representa o número de substituições de par de bases por site. *Rhizobium etli* CFN 42T (NC_004041) foi usado como grupo externo. Sequências nomeadas da mesma cor originam-se da mesma estirpe. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7.

