UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

Eficiência Agronômica e Filogenia de Estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas no Município de Seropédica-RJ em Feijão-caupi e Soja

Camila Pereira de Moraes Carvalho

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

EFICIÊNCIA AGRONÔMICA E FILOGENIA DE ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* ISOLADAS NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA-RJ EM FEIJÃO-CAUPI E SOJA

CAMILA PEREIRA DE MORAES CARVALHO

Sob a orientação do professor

Jerri Édson Zilli

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2023

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

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

C331e	Carvalho, Canila Pereira de Moraes, 1996- Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de feijão-caupi e soja / Israel Oliveira Ramalho. – Seropédica, 2023. 59 f.: il. Orientador: Jerri Édson Zilli. Dissertação (Mestrado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 2023. 1. Fixação Biológica do Nitrogênio. 2. Leguminosa. 3. *Bradyrhizobium*. 4. Filogenia. I. Zilli, Jerri Édson, 1974-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Agronomia - Ciência do Solo. III. Título.

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

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

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)

HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 7 / 2023 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.011555/2023-12

Seropédica-RJ, 02 de março de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA ? CIÊNCIA DO SOLO

CAMILA PEREIRA DE MORAES CARVALHO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2023.

Jerri Édson Zilli. Dr. Embrapa

(Orientador)

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Marcia Reed Rodrigues Coelho. Dra. Embrapa

(Assinado digitalmente em 02/03/2023 19:07)
IRENE DA SILVA COELHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.00.54)
Matrícula: 1815763

(Assinado digitalmente em 03/03/2023 07:06)
JERRI EDSON ZILLI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 927.881.579-91

(Assinado digitalmente em 08/03/2023 09:07)
MARCIA REED RODRIGUES COELHO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 078.863.237-00

Visualize o documento original em **https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **7**, ano: **2023**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **02/03/2023** e o código de verificação: **37b43bb96e**

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação à minha filha Lia,
meu maior amor.
Aos meus pais, Wânia e Jovino (*in memorian*),
sem vocês eu não conseguiria.
À minha irmã Carolina,
meu suporte de todas as horas.
À minha família e amigos,
que direta ou indiretamente contribuíram
para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e me guiar durante toda essa jornada, mostrando que por mais difícil que seja o caminho Ele está ao meu lado.

Agradeço ao meu pai Jovino, que em toda sua vida não poupou esforços para que eu tivesse uma boa educação.

À minha mãe Wânia, que me apoiou incondicionalmente durante todo o curso, auxiliando nos cuidados da minha filha para que eu pudesse realizar esse sonho.

À minha irmã Carolina, que me escutou e aconselhou nos momentos mais difíceis e não me deixou desanimar e desistir.

À minha filha Lia, que me alegra, anima e me dá forças pra continuar por mais que seja difícil. Obrigada por entender as minhas falhas e ausência durante esse período. Tudo o que eu faço é por você e para você!

Ao meu namorado, aos meus familiares e amigos que torceram e ainda torcem por mim, me incentivando e dando apoio nas horas mais difíceis. Obrigada por compreenderem minhas ausências.

Agradeço ao meu orientador Jerri Édson Zilli, pela parceria ao desenvolver este trabalho, pela confiança que depositou em mim e pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço também à banca examinadora composta pelos professores Irene Coelho e Leandro Azevedo e pelos pesquisadores Márcia Reed e Ederson da Conceição, por aceitarem fazer parte deste momento tão importante e especial na minha vida, contribuindo para minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço a todos os profissionais da Embrapa Agrobiologia, que me auxiliaram durante a realização do meu trabalho. Em especial aos funcionários Claudinho, Roberto Carlos, Ernane e Aurélio, que foram meu apoio durante os experimentos.

Agradeço às analistas do Centro de Recursos Biológicos – Johanna Döbereiner (CRB-JD), pelo apoio, incentivo e troca de experiências, em especial a Fernanda Dourado pela disponibilidade e ajuda durante as etapas de sequenciamento.

Aos amigos de laboratório pela companhia, ajuda e conselho, em especial aos amigos Isabelly, Jaqueline e Alysson, que nos momentos mais difíceis não me deixaram desanimar.

Agradeço a UFRRJ e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo pela oportunidade e suporte.

Agradeço a Embrapa Agrobiologia pela estrutura e o material necessário à realização deste trabalho e a CAPES pelo suporte financeiro.

BIOGRAFIA

Camila Pereira de Moraes Carvalho nasceu aos 12 dias do mês de setembro de 1996, no bairro de Santa Cruz, município e Estado do Rio de Janeiro. Filha de Wânia Pereira de Moraes Carvalho e Jovino Teixeira de Carvalho, concluiu em 2014 o Ensino Médio na Escola Técnica Estadual de Santa Cruz (ETESC). Em 2015, ingressou no Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), foi bolsista de Iniciação Científica da CAPES de agosto de 2016 a julho de 2019. Em 2020 obteve a titulação de licenciada em Ciências Biológicas, e em março do mesmo ano, ingressou no curso de Especialização em Ensino de Ciências na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Em março de 2021, iniciou o curso de Mestrado na UFRRJ, junto ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Ciência do Solo, área de concentração Biologia do Solo, desenvolvendo as atividades na Embrapa Agrobiologia – CNPAB, sob a orientação do Dr. Jerri Édson Zilli. Em junho de 2022, recebeu a titulação de especialista em Ensino de Ciências.

RESUMO

CARVALHO, Camila Pereira de Moraes Carvalho. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de feijão-caupi e soja.** 2023. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas e a utilização de fertilizantes nitrogenados agrava os problemas ambientais, além de gerar alto custo na produção. A exploração da simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico pode aumentar a produtividade das culturas e reduzir os custos de produção. Os objetivos desse trabalho foram avaliar estirpes de rizóbios isoladas de feijão-caupi e soja quanto a capacidade de nodulação cruzada entre estas espécies e eficiência na fixação biológica do nitrogênio e caracterizá-las por meio do sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA*, *gyrB* e *nodC*. Inicialmente foi realizado um experimento de autenticação da capacidade de nodulação de 50 estirpes de rizóbio isoladas de feijão-caupi e soja do campo experimental da Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica e inoculadas de forma cruzada nestes hospedeiros. Deste experimento foram selecionadas as estirpes BR 10737 e BR 13971 para um segundo experimento da avaliação da eficiência simbiótica em feijão-caupi, e as estirpes BR 13895, BR 13971 e BR 13986, para da soja. Estas bactérias foram testadas em um experimento de eficiência simbiótica comparando-as com as estirpes BR 3262 e BR 29, recomendadas pelo MAPA para inoculação de caupi e soja, respectivamente. Os números de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) foram avaliados. Foi observado que 31 estirpes nodularam o feijão-caupi e 11 a soja, demonstrando que esta leguminosa apresenta maior especificidade hospedeira. As estirpes BR 10737 e BR 13971, apesar de contribuírem para o crescimento das plantas, não apresentaram médias significativas de NN, MSN e MSPA em comparação com a inoculação padrão. As estirpes BR 13895 e BR 13971 também apresentaram médias significativamente inferiores para a maioria das variáveis na inoculação da soja. Somente a BR 13986 mostrou potencial para ser utilizada como inoculante para a cultura da soja, visto que suas médias foram semelhantes às da estirpe recomendada BR 29. Em seguida, foi realizada a amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA*, *gyrB* e *nodC*, e a construção das árvores filogenéticas. Com base nos resultados concluiu-se que as 50 estirpes pertencem gênero *Bradyrhizobium* e há uma alta diversidade entre as estirpes, com a indicação de novas espécies. Apesar das estirpes estarem estruturalmente associadas e filogenéticamente próximas pelo gene 16S rRNA, apresentam genes *nodC* bastante distintos. Foi concluído que há potencialmente cinco novas espécies, sendo quatro isoladas de feijão-caupi e uma da soja e com estirpes com potencial para testes como inoculantes, sobretudo para a soja.

Palavras-chave: Fixação Biológica do Nitrogênio. *Bradyrhizobium*. Leguminosas. Filogenia.

ABSTRACT

CARVALHO, Camila Pereira de Moraes Carvalho. **Symbiotic efficiency of nitrogen-fixing bacteria strains from cow pea and soybeans**. 2023. 59p. Dissertation (Master in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Nitrogen is the nutrient required in greater amount by plants and the use of nitrogen fertilizers aggravates environmental problems, in addition to generating high production costs. Exploring the symbiosis between legumes and atmospheric nitrogen-fixing bacteria can increase crop yield and reduce production costs. The objectives of this work were to evaluate rhizobia strains isolated from cowpea and soybean in terms of cross-nodulation capacity between these species and efficiency in biological nitrogen fixation, and to characterize them through the sequencing of the 16S rRNA, *recA*, *gyrB* and *nodC* genes. Initially, an experiment was carried out to authenticate the nodulation capacity of rhizobia 50 strains isolated from cowpea and soybeans in the experimental field of Embrapa Agrobiologia, in the municipality of Seropédica, and cross-inoculated in these hosts. From this experiment, strains BR 10737 and BR 13971 were selected for a second experiment to evaluate the symbiotic efficiency in cowpea, and strains BR 13895, BR 13971 and BR 13986, for soybean. These bacteria were tested in a symbiotic efficiency experiment comparing them with strains BR 3262 and BR 29, recommended by MAPA for cowpea and soybean inoculation, respectively. The number of nodules, dry mass of nodules and dry mass of shoots were evaluated. It was observed that 31 strains nodulated cowpea and 11 the soybean, demonstrating that this legume has greater host specificity. Strains BR 10737 and BR 13971, despite contributing to plant growth, did not show significant means of NN, MSN and MSPA compared to the standard inoculation. Strains BR 13895 and BR 13971 also showed significantly lower means for most variables in soybean inoculation. Only BR 13986 showed potential to be used as an inoculant for the soybean crop, since its averages were similar to those of the recommended strain BR 29. Then, the amplification and sequencing of the 16S rRNA, *recA*, *gyrB* and *nodC* genes was carried out, and the construction of phylogenetic trees. Based on the results, it was concluded that the 50 strains belong to the genus *Bradyrhizobium* and there is a high diversity among the strains, with the indication of new species. Despite the strains being structurally associated and phylogenetically closed by 16S rRNA gene, they present quite distinct *nodC* genes. It was concluded that there are potentially five new species, four isolated from cowpea and one from soybean and with strains with potential for testing as inoculants, especially for soybean.

Keyword: Biological Nitrogen Fixation. *Bradyrhizobium*. Legumes. Filogeny.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes isoladas dos campos experimentais da Embrapa Agrobiologia utilizadas no estudo..... 51

Tabela 2: *Primers* e condições de amplificação…..... 13

Tabela 3: Capacidade de indução de nodulação em feijão-caupi e soja por estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas destes hospedeiros em experimento de inoculação cruzada..... 15

Tabela 4: Nodulação e matéria seca da parte aérea de plantas de feijão-caupi e soja em experimento de autenticação de nodulação com inoculação cruzada com estirpes de rizóbios isoladas deste hospedeiros..... 17

Tabela 5: Nodulação e matéria seca de plantas de de feijão-caupi e soja em experimento de eficiência simbiótica de estirpes obtidas destes dois hospedeiros..... 20

Tabela 6: Comparação entre as médias do primeiro e segundo experimento para feijão-caupi..... 20

Tabela 7: Comparação entre as médias do primeiro e segundo experimento para soja..... 22

Tabela 8B: Caracterização morfocultural das estirpes..... 54

Tabela 9C: Lista do código de acessos do NCBI das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium*..... 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros..... 24

Figura 2: Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros..... 27

Figura 3: Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *recA* das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros..... 30

Figura 4: Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gyrB* das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros..... 31

Figura 5: Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *nodC* das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros..... 34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 1
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 3
2.1 Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]..... 3
2.2 Feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]..... 5
2.3 Fixação Biológica do Nitrogênio..... 6
2.3.1 Especificidade hospedeira..... 7
2.4 Taxonomia de Bactérias..... 9
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 11
3.1 Local do Desenvolvimento do Estudo..... 11
3.2 Experimento de Inoculação Cruzada em Casa de Vegetação..... 11
3.2.1 Eficiência simbiótica em casa de vegetação..... 11
3.3 Caracterização Molecular e Filogenética..... 12
3.3.1 Extração de DNA..... 12
3.3.2 Amplificação e sequenciamento dos genes 16S RNA, *recA*, *gyrB* e *nodC*…... 12
3.3.3 Análises filogenéticas..... 14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 15
4.1 Experimento de Inoculação Cruzada em Casa de Vegetação…..... 15
4.1.1 Eficiência simmbiótica em casa de vegetação..... 19
4.2 Análises Moleculares..... 23
4.2.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA..... 23
4.2.2 Análises filogenéticas dos gene housekeeping *recA* e *gyrB*..... 28
4.2.3 Análises filogenéticas do gene simbiótico *nodC*..... 32
5. CONCLUSÕES..... 35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 36
7. ANEXOS..... 51

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos elementos que constantemente limitam a produção agrícola. Quando em excesso pode levar à contaminação do meio ambiente e em baixa concentração, restringe a produtividade, (MARTINELLI, 2007). Em sistemas onde há baixa disponibilidade de nitrogênio para a produção agrícola, são necessárias estratégias para aportar nitrogênio, a fim de aumentar os ganhos de produtividade. Uma das possibilidades é a busca de novos inoculantes com eficiência agronômica e adaptabilidade às condições regionais (SOARES, 2009).

Apesar de estar presente em grande quantidade na atmosfera (aproximadamente 78%), o N_2 não é assimilado pelas plantas. Uma das formas de ingresso de N aos sistemas é a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), processo biológico que reduz o N_2 a NH_3, que depois se transforma em NH_4^+, uma das formas que as plantas conseguem utilizar o nitrogênio em seu metabolismo. A FBN é mediada por organismos que apresentam a enzima nitrogenase. Esses microrganismos podem ser bactérias de vida livre ou ainda as que possuem capacidade de estabelecer simbiose com plantas, chamados genericamente de rizóbios (MOREIRA et al., 2008). Essas bactérias são chamadas de forma geral de promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e colonizam as raízes e outros tecidos vegetais internos, sem trazer prejuízos às plantas (REIS, 2007).

No solo, as bactérias do grupo dos rizóbios, assim como outros microrganismos se multiplicam na rizosfera, região onde há intensa proliferação de pelos radiculares. Esses microrganismos se aderem à epiderme dos pelos absorventes, após sinais moleculares, que ativam os genes "*nod*" da nodulação da bactéria responsáveis por determinar a infecção das raízes e formação dos nódulos (CÂMARA, 2014).

A soja e o feijão-caupi fazem parte da família Fabacea e são espécies capazes de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, ou seja, as suas raízes além de exercerem as funções de ancoragem e absorção de água e nutrientes, também fazem associações com bactérias diazotróficas. Tanto as culturas da soja quanto do feijão-caupi já possuem bactérias recomendadas comercialmente para a inoculação. Cada cultura possui quatro bactérias recomendadas e apresentadas na instrução normativa 13 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2011).

O padrão de nodulação e a especificidade de nodulação é bastante diferenciada entre estas culturas. Ao passo que a soja nodula de forma específica com apenas algumas estirpes dentro de algumas espécies de *Bradyrhizobium* (HUNGRIA et al., 1994), o feijão-caupi nodula com dezenas de espécies bacterianas, dentro de vários gêneros (LEWIN et al., 1987). O que diferencia estas duas culturas parece ser a capacidade de identificar determinados fatores de nodulação produzidos pelas bactérias, que são determinados pela composição dos genes de nodulação (genes *nod*). Neste caso, a soja até onde se sabe nodula exclusivamente com bactérias da "simbiovar" "Glycinearum", enquanto o feijão-caupi nodula com inúmeras estirpes de diversos simbiovares (VINUESA et al., 2005).

Contudo, apesar das diferenças de nodulação entre estas duas espécies, sabe-se que algumas das estirpes que nodulam soja também tem capacidade de nodular o feijão-caupi e vice-versa. Por exemplo, já foi mostrado que as estirpes recomendadas para a cultura da soja pertencentes a espécie *Bradyrhizobium elkanii* não apenas nodulam o feijão-caupi, como também apresentam eficiência na FBN com esta cultura; por outro lado, as estirpes de *B. japonicum* e *B. diazoefficiens* são capazes de nodular, porém não são eficientes (ZILLI et al., 2011). Assim, entender a relação entre estirpes isoladas de soja e feijão-caupi e a capacidade

de nodular com uma ou outra espécie ainda não está totalmente compreendido. E, estas dúvidas precisam ser esclarecidas, à medida que estas culturas vêm sendo utilizadas dentro de mesmos sistemas de produção.

Desse modo, partindo da hipótese de que as estirpes apresentam alto desempenho em fixar nitrogênio com as culturas de feijão-caupi e soja, independentes de qual hospedeiro elas sejam provenientes, o objetivo geral do estudo foi avaliar estirpes de rizóbio isoladas de feijão-caupi e soja quanto a capacidade de nodulação cruzada entre estas duas espécies de leguminosas e eficiência na fixação de nitrogênio, além caracterizá-las por sequenciamento do gene 16S rRNA, *recA*, *gyrB* e *nodC*.

Para se alcançar o objetivo geral do estudo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a relação entre as estirpes de rizóbios e sua capacidade de nodular o hospedeiro diferente do qual foram isoladas.
- Avaliar o potencial de promoção de crescimento de plantas através de ensaios pilotos em casa de vegetação com a inoculação de estirpes nas culturas de feijão-caupi e soja.
- Comparar o efeito da inoculação de novas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio com outras atualmente autorizadas pelo MAPA e com os controles com adubação nitrogenada mineral e a testemunha sem nenhuma fonte de nitrogênio.
- Identificar a posição taxonômica das estirpes isoladas de feijão-caupi e soja nos campos experimentais da Embrapa e os simbiovares presentes entre as estirpes bacterianas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie com um ciclo de vida de 70 a 200 dias, possui germinação egípia da semente e é uma herbácea. Esta leguminosa apresenta uma boa qualidade fisiológica das sementes, tem resistência a pragas, doenças, herbicidas e possui alta produtividade (SEDIYAMA, 2009). O gênero *Glycine* faz parte da família Fabaceae, uma das maiores famílias botânicas, com ampla distribuição, tendo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18 mil espécies.

A soja tem origem no nordeste da Ásia, mais precisamente na China e em regiões próximas (MERRILL, 1931). O ingresso da soja na agricultura ocidental tardiamente pode ter ocorrido por conta do isolamento geográfico e cultural, o baixo intercâmbio turístico e a não miscigenação, apesar dos navegadores italianos já terem conhecimento da culinária da soja desde o século XVI (CARLETTI, 1964).

A cultura da soja é a principal *commodity* agrícola do país e tem grande destaque no mercado mundial, além de ser a principal oleaginosa cultivada anualmente no mundo (HIRAKURI & LAZZAROTTO, 2014). Os grãos são comumente usados pelo agronegócio, principalmente para a produção de óleo vegetal, rações para alimentação animal, indústria de alimentos e recentemente como fonte alternativa de combustível (COSTA NETO & ROSSI, 2000).

O cultivo da soja no Brasil foi relatado pela primeira vez no ano de 1882, no estado da Bahia (BLACK, 2000), posteriormente foi cultivada em São Paulo por imigrantes japoneses e somente em 1914, a soja foi cultivada no estado do Rio Grande do Sul. Nesta localidade, as variedades da soja se adaptaram melhor às condições edafoclimáticas, principalmente em relação ao fotoperíodo (BONETTI, 1981).

O primeiro cultivo comercial da soja foi datado em 1914, no município de Santa Rosa, RS, porém a sua importância econômica foi considerada somente a partir dos anos 40. No ano de 1941, foi realizado o primeiro registro estatístico do cultivo da soja realizado no Anuário Agrícola do Rio Grande do Sul, em uma área cultivada de 640 hectares, com 450 toneladas de grãos produzidos e rendimento de 700 kg/ha (GAZZONI & DALL'AGNOL, 2008). Neste mesmo ano foi implantada a primeira indústria processadora de soja do Brasil, e em 1949, o país entrou para as estatísticas internacionais, como produtor de soja, com 25.000 toneladas de grãos produzidos (HASSE & BUENO, 1996).

O avanço da cultura em regiões de baixas latitudes se deu devido à implementação de programas de melhoramento de soja, através da incorporação de genes que atrasam o florescimento mesmo que em condições de fotoperíodo indutor (KIIHL & GARCIA, 1989). Isto possibilitou novas cultivares com alta adaptabilidade e estabilidade, promovendo uma alta produtividade dos grãos, o que permitiu a expansão dessa leguminosa no território brasileiro. A implantação do manejo integrado de pragas também contribuiu para o avanço da cultura pelo país, visto que os principais insetos causadores de danos econômicos foram controlados (FREITAS, 2011).

No decorrer das últimas décadas, o Brasil apresentou um grande avanço na produção de soja, ocasionada pelo aumento da área de semeadura e também pela implantação de técnicas de manejo que aumentaram a produtividade (FREITAS, 2011). Devido ao crescente volume de exportações, a soja tem-se destacado como uma cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro, contribuindo para a economia do país.

Entre os anos 2000 e 2019, o Brasil era o segundo maior produtor de soja, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América. A partir de 2020, o país alcançou o primeiro lugar

com 126 milhões de toneladas produzidas e 84 milhões de toneladas exportadas. Atualmente, o Brasil responde por 50 % do comércio mundial de soja, e as exportações brasileiras do grão somaram 30 bilhões de dólares em 2020 (FAOSTAT, 2020).

A cultura da soja necessita de grandes áreas para cultivo, ocupando grande parte do território destinado à agricultura de alguns estados brasileiros, como por exemplo, o Paraná e Mato Grosso (EMBRAPA, 2018). Segundo o último censo agropecuário brasileiro (IBGE, 2017a), o país possuía 236.245 estabelecimentos rurais voltados para a produção de soja em uma área total de cultivo de 30.722,657 hectares. Os estados com a maior produção de grãos em toneladas foram o Mato Grosso (29.778,544), Rio Grande do Sul (17.311,971) e Paraná (15.252,347), respectivamente.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil produziu 153.744,6 mil toneladas de soja no ano de 2022, e exportou 96.585,6 toneladas. O Mato Grosso ainda se manteve como o maior produtor de soja e atingiu 100 % da área prevista para a safra (CONAB, 2022).

Na região do Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, a soja vem ganhando destaque no mercado agrícola. Durante quatro safras agrícolas, entre os anos de 2017 a 2021, foram realizados 12 ensaios nos municípios de Campos de Goytacazes e Macaé (região norte fluminense), onde mais de 50 cultivares de soja foram avaliadas. Os resultados obtidos apontaram ao menos uma dezena de cultivares com rendimento médio de grãos semelhantes à média anual, que é de 3,3 mil kg / ha (EMBRAPA, 2021). Algumas cultivares produziram em média 5,5 mil kg / ha, ultrapassando a média anual.

O cultivo de soja nestas regiões do estado do Rio de Janeiro tem um grande desafio a ser superado em relação à época de plantio, visto que nessas regiões há predominância de um clima com altas temperaturas, e por isso, é necessária a seleção de cultivares com uma maior tolerância às maiores temperaturas, bem como testá-las em diversos sistemas de produção, a fim de mitigar os estresses provocados pelo clima (ZILLI & GUARESCHI, 2020).

A produtividade da soja é determinada pela interação da planta com o ambiente no qual ela está presente e o manejo dessa cultura. Os altos rendimentos serão obtidos quando as condições forem favoráveis, em todos os estádios de crescimento da cultura (PEREIRA et al., 2011). Sendo assim, são necessários estudos sobre o manejo de solos para o aprimoramento dos rendimentos desta cultura (GILIOLI et al., 1995). Com a implantação de programas de melhoramento genético no Brasil, pôde ocorrer o avanço da cultura de soja para regiões de latitudes mais baixas, através do desenvolvimento de plantas com maior estabilidade e adaptabilidade (KIILHL & GARCIA, 1989).

A soja tem grande adaptabilidade ao sistema de plantio direto e devido aos seus aspectos econômicos e sua eficiência na fixação biológica do nitrogênio, é a principal cultura que compõem os sistemas de rotação (KLUTHCOUSKI & STONE, 2003). Esse mecanismo pode proporcionar uma fixação entre 100 a 250 kg de N por hectare, podendo beneficiar as culturas sucessoras (MASCARENHAS et al., 2001; MERCANTE, 2003).

Resultados obtidos em diferentes regiões do País mostram que o plantio direto pode favorecer o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas (ALVES et al., 2000). Porém, o índice de N na cultura de soja na colheita normalmente equivale a produção de nitrogênio derivado da FBN, sendo assim, existe um balanço próximo da neutralidade de N para o solo (ZOTARELLI, 2000), mesmo que ainda existam dúvidas quanto a contribuição das raízes para o resultado final do balanço de nitrogênio.

Devido à alta importância econômica da soja, existe uma preocupação em saber se a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) atende as exigências em nitrogênio, demandada pelo cultivo de soja no Brasil.

2.2 Feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), conhecido popularmente como feijão-fradinho, feijão de corda ou feijão de praia, apresenta tolerância à seca, podendo ser cultivado em diferentes condições climáticas (das NEVES et al., 2011). É uma leguminosa que apresenta ciclo de vida curto, de 60 a 80 dias, possui baixa exigência hídrica e de fertilidade do solo, além de ser adaptada às condições de temperaturas elevadas (EMBRAPA, 2003). O caupi está entre as 14 espécies mais cultivadas no mundo, sendo uma cultura com grande destaque na economia nordestina (RAVEN et al., 2007).

Com origem no continente Africano, o feijão-caupi foi introduzido na América Latina no século XVI pelos colonizadores (ANDRADE JUNIOR et al., 2002). No Brasil, o caupi foi cultivado inicialmente no estado da Bahia (FREIRA FILHO et al., 2005), e posteriormente se espalhou por grande parte do Nordeste. Tem um importante significado social, visto que são plantados como agricultura de subsistência, onde os agricultores comercializam os seus excedentes de produção em feiras livres, gerando emprego e renda, tanto na zona rural, quanto na zona urbana (SANTOS et al., 2010; LIMA et al., 2007).

O feijão-caupi é um grão com alto valor proteico (AKANDE, 2007), tendo o seu cultivo principalmente nos países asiáticos e africanos (FREIRE FILHO et al., 2005). Por ser adaptado às regiões tropicais úmidas, foi introduzido no Brasil e adaptou-se às diferentes regiões, tipos de climas e sistemas de produção (BEZERRA et al., 2008; ARAGÃO et al., 2011; SOUZA et al., 2011), devido à sua alta plasticidade em relação a fatores abióticos (FREIRE FILHO et al., 2005; ROCHA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Tem grande importância socioeconômica nas regiões Norte e Nordeste (ZILLI et al., 2006), sendo expandido para a Região Centro-Oeste (FREIRE FILHO et al., 2009).

Ao longo dos anos, o feijão-caupi tem adquirido maior expressão econômica no Brasil devido a expansão das áreas de cultivo em direção ao Cerrado (SILVA JUNIOR et al., 2018). Nas regiões Norte e Nordeste, a cultura é cultivada em regime de subsistência, já no Maranhão e Piauí, ele é cultivado após a colheita de arroz, utilizando os nutrientes residuais (ZILLI et al., 2006), e no Centro-Oeste, especialmente no Mato Grosso vem sendo utilizado com sucesso plantio de safrinha.

Segundo o último censo agropecuário brasileiro (IBGE, 2017b), o país tinha 932.947 estabelecimentos voltados para a produção de feijão-caupi em uma área total de cultivo de 686.590 hectares. O estado do Mato Grosso foi o maior produtor de feijão-caupi com uma produção de 165.277 toneladas, seguido do Ceará, com 69.347 toneladas e pelo estado da Bahia, com 61.504 toneladas.

Segundo a Conab, o Brasil bateu o recorde de exportações de feijão-caupi no ano de 2021, com um quantitativo de 222 mil toneladas. Já em 2022, o Mato Grosso, maior exportador de feijão-caupi, teve uma importante redução na produção em detrimento do milho, mas ainda assim, o Brasil exportou 150 mil toneladas de grãos (CONAB, 2022).

A expansão das áreas de cultivo do feijão-caupi fez com que os médios e grandes produtores investissem nessa cultura, fazendo uso de um maior aporte tecnológico. O uso dessas tecnologias que promovem o maior potencial produtivo da cultura tem sido um diferencial para a produtividade em alguns estados, como o Mato Grosso. Neste estado, o feijão-caupi substituiu o milho safrinha plantado após a retirada da soja, no município de Primavera do Leste (MT), nesta região os agricultores conseguiram um bom substituto ao milho que não possuía altos rendimentos entre as safras de soja, devido aos períodos de chuva (SINIMBU, 2009).

O feijão-caupi é uma cultura que tem grandes atributos como a baixa exigência hídrica e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade (ZILLI; VILARINHO; ALVES, 2009). Além de possuir capacidade de nodular com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (ALMEIDA et al., 2010), processo que favorece a fixação biológica do nitrogênio, reduzindo

os custos de produção, visto que a quantidade de nitrogênio fixado é o suficiente para seu desenvolvimento.

Estima-se que a área plantada com a cultura do feijão-caupi na Região Amazônica seja de 150 mil hectares, sendo o aumento da produtividade dos grãos relacionado com a inoculação de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2006; ZILLI et al., 2008). Nesses trabalhos, foi constatado que a inoculação de estirpes bacterianas eficientes é capaz de substituir a adubação nitrogenada e aumentar o rendimento de grãos do feijão-caupi em mais de 30%.

Com a expansão do feijão-caupi no território brasileiro, tem-se a necessidade de realizar estudos que possibilitem o maior aporte de nitrogênio para esta cultura, de forma a suprir a necessidade nutricional da planta para o seu desenvolvimento.

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para os organismos vivos, sendo encontrado em muitos compostos fundamentais para a vida, incluindo os ácidos nucleicos (DNA e RNA), aminoácidos, proteínas, vitaminas e hormônios. Este elemento é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo importante na síntese de clorofila, formação das enzimas e de outras moléculas. Apesar de estar presente abundantemente na atmosfera (cerca de 78%), o gás dinitrogênio (N_2) não é assimilável por organismos eucariotos, ou seja, nenhuma planta ou animal consegue utilizá-lo nessa forma. Por ser requerido em uma maior quantidade, a sua baixa disponibilidade em solos, particularmente nos trópicos, é fator limitante à produção agrícola (MEYER, 2022).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o N_2 é reduzido em NH_3 e depois convertido a NH_4^+ que é a forma assimilável pelas plantas. Esse processo só é possível devido a habilidade de organismos procariotos possuírem um complexo enzimático nitrogenase capaz de romper a tripla ligação do N_2, que o torna inerte, e convertê-lo em NH_3, conforme a seguinte reação:

$$N_2 + 8\ e^- + 8\ H^+\ 16\ MgATP \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ MgADP + 16\ Pi$$

Acredita-se que a FBN evoluiu a partir da escassez das reservas geoquímicas de nitrogênio na biosfera. O esgotamento desses óxidos de nitrogênio pelos organismos provavelmente limitou o crescimento e ocasionou uma pressão seletiva, que permitiu o aparecimento de organismos diazotróficos (LEMOS, 2011).

O conjunto de genes responsáveis pela síntese e atividade da enzima nitrogenase, são denominados genes *nif* e *fix*, que foram transferidos horizontalmente para outros procariotos ao longo da evolução. Esses procariotos são conhecidos como diazotróficos, estando presentes em diversas espécies de bactérias e arqueias e habitando os ecossistemas terrestres e aquáticos (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2013).

Atualmente, são conhecidos três tipos de enzima nitrogenase: a nitrogenase que utiliza molibdênio (nitrogenase Mo), a nitrogenase que na baixa de molibdênio utiliza vanádio e ferro (nitrogenase VFe) e nitrogenase que contém apenas ferro (nitrogenase Fe) (NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003).

A nitrogenase é uma enzima que pode reagir com o componente Fe das proteínas e por isso é extremamente sensível ao oxigênio. Em vista disso, as bactérias possuem algumas estratégias para a proteção da nitrogenase da molécula de O_2. As bactérias da espécie *Azotobacter* têm um elevado metabolismo respiratório que mantém os níveis de O_2 baixo nas células. Algumas bactérias produzem polissacarídeos extracelulares a fim de limitar a difusão de O_2 para o interior das células. A fixação do nitrogênio nas cianobactérias ocorre nos heterocistos, que possuem apenas o fotossistema I e não geram oxigênio. Nas leguminosas, a

FBN ocorre dentro dos nódulos, onde a proteína leghemoglobina é sintetizada e controla o suprimento de oxigênio para os tecidos nodulares (VIEIRA, 2017).

2.3.1 Especificidade hospedeira

A fixação biológica do nitrogênio em plantas da família Fabaceae ocorre pela simbiose entre bactérias rizóbios com as raízes ou em alguns casos caule das plantas, formando estruturas especializadas denominadas de nódulos. Nesses nódulos, a bactéria na forma de bacteroide realiza o processo de redução do nitrogênio em amônia, forma assimilável pela planta hospedeira. Para que esta reação possa acontecer é preciso que seja fornecida a energia necessária em forma de ATP (HOFFMANN, 2007). A leguminosa fornece a fonte de carbono e um ambiente favorável à fixação do nitrogênio para os rizóbios.

A formação dos nódulos é um processo complexo com uma intensa troca de sinais entre as bactérias e as plantas hospedeiras e envolve uma sequência de estágios, sendo o primeiro deles a exsudação de compostos flavonoides e isoflavonoides pelas raízes. Em resposta, as bactérias desencadeiam a expressão de uma série de genes da nodulação (*nod*, *nol*, *noe*), que são essenciais para a síntese e secreção de lipoquitooligossacarídeos, denominados fatores *nod* (VIEIRA, 2017). A ativação destes genes induz a bactéria a produzir outras moléculas que ativam genes da planta hospedeira, responsáveis pela continuidade da infecção, formando os nódulos. Os flavonoides são liberados de forma contínua na rizosfera, e na presença da bactéria simbiótica compatível, a sua concentração e os diferentes tipos aumentam. Estes compostos podem ser indutores de uma espécie de rizóbio e ao mesmo tempo ser repressora de outra espécie (BEGUM et al., 2001).

Segundo Vieira (2017), as etapas do processo de infecção e desenvolvimento dos nódulos radiculares são:

> a. As bactérias enviam sinais químicos para a planta por meio dos produtos dos ´fatores Nod`, provocando o encurvamento do pelo radicular, o início da divisão celular no córtex da raiz e a indução do meristema do nódulo.
> b. Após a adesão das bactérias aos pelos radiculares, ocorre a dissolução da parede celular, permitindo a entrada das bactérias nas raízes.
> c. Esse processo dá início à formação de um cordão de infecção, que se desenvolve e se estende até o córtex da raiz, transportando a bactéria para o meristema do nódulo.
> d. Os rizóbios se transformam em bacteroides e não se dividem mais. A fixação do nitrogênio inicia-se após a formação dos bacteroides.
> e. Durante o processo de estabelecimento da simbiose, a planta também expressa proteínas específicas do nódulo que se chamam nodulinas.
> f. Quando os nódulos se deterioram, as bactérias passam ao solo. Embora os bacteroides percam a capacidade de divisão, algumas bactérias que permaneceram em fase latente dentro dos nódulos, proliferam no solo utilizando como nutrientes os produtos dos nódulos em decomposição. Deste modo, as bactérias podem iniciar o processo de infecção em outras raízes ou manter-se em estado livre no solo. (VIEIRA, 2017, p. 46).

A especificidade hospedeira é a habilidade de uma estirpe de rizóbio formar nódulos e/ou fixar nitrogênio quando associadas a um cultivar ou espécie de hospedeiro específico, à vista disso, é uma característica a ser considerada em programas de seleção de novas estirpes (PERES et al., 1993).

O grau de especificidade hospedeira está relacionado a um complexo conjunto de informações genéticas entre a planta hospedeira e bactéria (PERRET et al., 2000). Outros mecanismos como adsorção preferencial de células infectivas nas raízes da leguminosa hospedeira, interação específica entre lipopolissacarídeos de *Rhizobium* e lectinas de plantas e compostos presentes em exsudatos de raízes, que favorecem o processo de nodulação também

estão relacionados com o grau de especificidade hospedeira (DAZZO et al., 1976; WOLPERT & ALBERSHEIM, 1976; CHAKRABARTI et al., 1981; ROVIRA, 1961; HUNTER & FAHRING, 1980).

Os fatores "*nod*" produzidos pelas bactérias, são resultado da expressão de genes nod, responsáveis pela produção e encurvamento dos pêlos radiculares (HIRSCH et al., 2001). Juntamente com os flavonoides exsudados pelas plantas hospedeiras, que podem ser reconhecidos por uma gama de bactérias ou apenas por poucas bactérias, regulam a especificidade ou a promiscuidade entre os pares simbiontes.

O feijão-caupi apresenta baixa especificidade de nodulação, sendo considerada uma planta promíscua, isto é, capaz de nodular com diversas espécies de bactérias do grupo rizóbio. Esse tipo de simbiose é considerada a mais antiga e mais distribuída do que a simbiose restritiva (PERRET et al., 2000).

De acordo com Rumjanek et al. (2005), as estirpes responsáveis pela nodulação são bastante competitivas na formação dos nódulos, porém pouco eficientes no nitrogênio fixado. A busca por novos inoculantes para feijão-caupi dispõe de diversas pesquisas ao longo dos anos. Os estudos visam selecionar estirpes que promovam a FBN e que sejam capazes de competir com os rizóbios presentes nos solos ou com as estirpes já introduzidas.

A competitividade é a capacidade que uma estirpe de rizóbio tem de crescer, sobreviver e colonizar os sítios de nodulação em prejuízo de outros rizóbios (LUPWAYI et al., 2005). Esses sítios de nodulação presentes nas leguminosas são os locais onde os rizóbios infectam a planta hospedeira e iniciam o cordão de infecção em direção ao córtex radicular (REIS; FERNANDES JUNIOR; 2008).

Além de nodular com diversas espécies de rizóbios, também nodula com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e β-proteobactérias do gênero *Burkholderia*, variando a eficiência devido às incompatibilidades no processo de formação dos nódulos, ocasionando nódulos ineficazes que não promovem a FBN (MICHIELS et al., 1998).

Apesar do feijão-caupi nodular com uma gama de estirpes de rizóbios, existem importantes diferenças entre as estirpes na FBN, quando em associação com esta cultura (ZILLI et al., 2009). A maior eficiência simbiótica tem sido demonstrada pelas espécies de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii,* e até mesmo entre essas estirpes tem sido observada uma variação da FBN (MARTINS et al., 2003).

Atualmente existem quatro estirpes de *Bradyrhizobium sp.* que são recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a inoculação do feijão-caupi: UFLA 3-84 (SEMIA 6461), BR 3267 (SEMIA 6462), INPA 03-11B (SEMIA 6463) e BR 3262 (SEMIA 6464) (MAPA, 2011). Estas estirpes contribuem positivamente para o fornecimento de N para a cultura do feijão-caupi, nodulação e aumento de produtividade (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; ZILLI et al., 2008).

A cultura da soja demonstrou uma alta especificidade hospedeira, e ao longo dos anos pesquisas foram feitas a fim de identificar estirpes que apresentassem a capacidade de nodular a soja, e que competissem com os rizóbios já estabelecidos no solo. Por ser uma cultura exótica, os solos brasileiros não possuíam estirpes eficientes em nodular a soja (FERREIRA & HUNGRIA, 2002; HUNGRIA et al., 2006; LOUREIRO et al., 2007) de modo que trabalhos realizados em áreas de primeiro cultivo demonstraram que a nodulação era zero ou próxima disso (HUNGRIA et al., 1994).

A primeira estirpe recomendada para a soja no Brasil foi a SEMIA 566 isolada da cultivar Hardee inoculada com um inoculante norte americano (MEYER, 2022). A SEMIA 587 foi isolada em 1967, a partir de uma cultivar de soja no Rio Grande do Sul, demonstrando ser eficiente em experimentos em campo (FREIRE & VIDOR, 1981), porém não apresentava um bom desempenho para outras regiões do Brasil. Diante disso, novos estudos foram realizados para a seleção de estirpes que pudessem ser recomendadas para o cultivo da soja nos Cerrados

brasileiros, e com isso foi selecionada a estirpe SEMIA 5019, que é utilizada até hoje na produção de inoculantes.

Atualmente são recomendadas quatro estirpes para a inoculação da soja: CPAC 15 (SEMIA 5079) e CPAC 7 (SEMIA 5080), pertencentes à espécie *B. japonicum*, e SEMIA 587 e BR 29 (SEMIA 5019), pertencentes à espécie *B. elkanii*. Novas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de identificar potenciais estirpes que possam ser recomendadas como inoculantes para a soja.

O sucesso da inoculação com as estirpes recomendadas depende de diversos fatores e um deles é a característica do hospedeiro com o qual ela se relaciona. No trabalho de Carvalho et al. (2008), foi observado que a eficiência simbiótica das estirpes brasileiras de *B. japonicum* e *B. elkanii* foi dependente da cultivar de soja utilizada, isto também foi observado em outros trabalhos (CARVALHO et al., 2005; HUNGRIA & BOHRER, 2000).

Na cultura da soja, a espécie *B. elkanii* apresentou a característica de maior capacidade de competir com as estirpes nativas no solo e ocupar os nódulos e a espécie *B. japonicum* de contribuir para o maior acúmulo de N (BODDEY & HUNGRIA, 1997; NEVES & RUMJANEK, 1997; TEANEY & FUHRMANN, 1992). Segundo Santos et al. (1996) a presença da enzima hidrogenase ativa na associação das estirpes de *B. japonicum* com a soja foi responsável por essa diferença entre as espécies, já que a *B. elkanii* apresenta muitos nódulos inativos.

2.4 Taxonomia de Bactérias

A taxonomia é a ciência que estuda a classificação, ou seja, a ordenação dos grupos taxonômicos de acordo com a nomenclatura, identificação dos organismos e com a similaridade entre eles (VANDAMME et al., 1996). Durante muitos anos, os estudos taxonômicos na área da microbiologia tinham pouca relevância devido às grandes dificuldades na classificação destes microrganismos, os métodos baseados somente em características fenotípicas resultavam em formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos (BUSSE et al., 1996).

Com o avanço dos métodos de classificação, chegou-se a um consenso de que a taxonomia polifásica é indicada para a identificação e definição de novas espécies bacterianas. Esse tipo de taxonomia é um modelo de estudo integrado que utiliza diferentes tipos de dados e informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (AZEVEDO, 2015).

Recentemente, o *International Committee on Systematics of Prokaryotes* estabeleceu padrões mínimos para a descrição de novos gêneros e espécies de rizóbios e agrobactérias, a partir dos seguintes padrões: uma sequência de genoma deve estar disponível para a estirpe tipo; e evidências de diferenciação de outras espécies devem ser fornecidos e ser baseado em sequências do genoma da estirpe tipo (de LAJUDIE et al., 2019).

Nos laboratórios de microbiologia, a caracterização fenotípica é a primeira etapa no processo de identificação de bactérias (BOONE & CASTENHOLZ, 2001). Os métodos envolvem a caracterização morfológica das culturas (forma, coloração, produção de muco e etc); as características fisiológicas e bioquímicas (crescimento em diferentes temperaturas, pH, composição celular e etc), que auxiliam na elucidação sobre a adaptabilidade ecológica às condições ambientais; e suas aplicações biotecnológicas (PONTES et al., 2007).

Os métodos genotípicos estão relacionados com as informações contidas nas moléculas de DNA e RNA e atualmente são os mais utilizados no estudo da taxonomia moderna de bactérias. Dentre esses métodos estão a porcentagem das bases G+C (Guanina + Citosina), hibridização DNA-DNA, Reação em Cadeia de Polimerase, sequenciamento, entre outros (STACKEBRANDT et al., 2002).

Uma das técnicas para comparação entre os genomas é a *Average Nucleotide Identity* (ANI), que permite calcular a identidade média de nucleotídeos a partir da comparação entre

dois genomas em pares, onde um par serve como consulta e o outro como sequência de referência. Esta técnica é uma alternativa de substituição a hibridização DNA-DNA, e por isso diferentes algorítmos vão sendo desenvolvidos a fim de melhorar o tempo de cálculo e promover uma maior comparação genômica (PALMER et al., 2020).

Uma técnica muito utilizada para as análises taxonômicas é a comparação do gene 16S rRNA, que foi estabelecido como um dos melhores marcadores filogenéticos para bactérias. Segundo Peixoto et al. (2002), o 16S rRNA preenche todos os requisitos que definem um marcador universal, pois apresenta regiões altamente conservadas, está presente e tem a mesma função em todas as espécies, não é afetado por mudanças ambientais e possui um tamanho relativamente grande, o que permite as comparações significativas.

Ainda que muito usado na filogenia e taxonomia procariota, o gene 16S rRNA é considerado limitante na designação de espécies devido o alto grau de conservação em sua sequência, o que dificulta a distinção de espécies muito relacionadas (BARRERA et al., 1997; COENEY et al., 2001; STACKEBRANDT et al., 2002). No grupo dos rizóbios existem indícios de que genes ribossômicos sofrem transferência lateral e recombinação genética, implicando diretamente na biologia evolutiva das populações bacterianas e na classificação taxonômica (VAN BERKUM et al., 2003).

Diante disso, surgiu a necessidade de buscar novas alternativas que superassem as limitações do gene 16S rRNA. Logo, foram utilizados os marcadores moleculares com a taxa de evolução mais rápida que o 16S, mas conservado o suficiente para reter informações genéticas (MARTENS et al., 2007). Esses genes são conhecidos como *housekeeping*, que codificam proteínas e enzimas participantes do metabolismo da célula, ou seja, essenciais para a sobrevivência do microrganismo (DALL'AGNOL et al., 2013).

Para o estudo das relações filogenéticas dentro do gênero *Bradyrhizobium* tem sido utilizados os genes housekeeping *recA*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB* e a*tpD* (ORMEÑO-ORRILO et al., 2006; VINUESA et al., 2005). Cada um desses genes possui uma função específica dentro da célula, o *recA* é responsável por codificar a recombinase A; *dnaK* codifica a proteína de choque térmicp Hsp70; *glnII* codifica a glutamina sintetase II; *gyrB* subunidade β da girase do DNA; *rpoB* transcrição do DNA a RNA; e *atpD* responsável por codificar a subunidade beta da ATP sintase da membrana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Desenvolvimento do Estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Centro de Recursos Biológicos - Johanna Döbereiner (CRB - JD) localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizada no município de Seropédica/RJ (22°48' S, 43°42' W e a 33 m de altitude). Todas as estirpes utilizadas neste trabalho foram obtidas anteriormente a este estudo e encontram-se depositadas na coleção de culturas do CRB-JD. As 50 bactérias foram isoladas a partir do cultivo de plantas iscas de feijão-caupi ou a partir de nódulos coletados diretamente na cultura de soja nos campos experimentais da Embrapa Agrobiologia e isolados em meio 79 (FRED & WASKMAN, 1928) (Tabela 1A).

3.2 Experimento de Inoculação Cruzada em Casa de Vegetação

No período de março a maio de 2022 foi conduzido um experimento em casa de vegetação, com o objetivo de verificar a formação de nódulos em plantas de feijão-caupi e soja com as 50 bactérias selecionadas para o estudo. O experimento foi montado em vasos de Leonard (VICENT, 1970), em delineamento em blocos casualizados com três repetições. A parte de cima dos vasos de Leonard continha o substrato em proporção de 1:1 de pedrisco e de vermiculita e a parte de baixo continha 300 mL de água esterilizada. O vaso foi dividido ao meio no sentido vertical, a fim de separá-lo em duas partes distintas, uma parte para receber as sementes de feijão-caupi e outra parte para as sementes de soja. A divisão foi feita com uma tira de plástico autoclavável recortado nas medidas do interior do vaso. As garrafas foram enroladas em papel pardo e foram esterilizadas em autoclave.

As sementes de feijão-caupi (BRS Guariba) e de soja (BRS 5980IPRO) foram esterilizadas por meio das seguintes etapas: lavagem com etanol a 70%, por 30 seg.; desinfestação com hipoclorito de sódio 5%, por 3 min.; e lavagem com água esterilizada por 10 vezes, sucessivamente. Após a desinfestação das sementes, elas foram dispostas na superfície dos vasos Leonard. Foram distribuídas três sementes de feijão-caupi e três de soja para cada vaso, posteriormente as sementes foram cobertas por uma camada de areia autoclavada.

Os tratamentos utilizados no experimento foram as 50 estirpes (Tabela 1A), um controle isento de inoculante e N (controle absoluto) e outro tratamento nitrogenado (25 mg de N por vaso por semana, na forma de NH_4NO_3), isento de inoculante. Para o preparo do inóculo, as bactérias foram cultivadas em 20 mL de meio TY líquido (DÖBEREINER, 1999) em erlenmeyer de 250 mL, sob agitação de 150 rpm até apresentarem crescimento. A inoculação foi realizada após sete dias de crescimento, foi adicionado 1 mL de inóculo por plântula. A solução nutritiva de Norris (GRUZMAN & DÖBEREINER, 1968) foi fornecida semanalmente, em volume de 400 mL por vaso, e irrigação com água esterilizada, quando necessário.

As plantas foram coletadas 45 dias após a emergência (DAE) para a determinação do número de nódulos, massa seca da parte aérea e massa seca dos nódulos. A parte aérea das plantas e os nódulos foram secos em estufa a 65°C, por 7 dias.

3.2.1 Eficiência simbiótica em casa de vegetação

No período de outubro a novembro de 2022 foi realizado o experimento para avaliação da eficiência na FBN em casa de vegetação com o objetivo de comparar o efeito das estirpes

testadas no primeiro experimento com estirpes recomendadas pelo MAPA para inoculação do feijão-caupi e da soja.

Os tratamentos utilizados foram a inoculação com as estirpes BR 10737 e BR 13971, para feijão-caupi; BR 13895, BR 13971 e BR 3986 , para soja; a estirpe BR 29 (SEMIA 5019) recomendada para soja, BR 3262 (SEMIA 6464) recomendada para feijão-caupi, um controle absoluto (isento de inoculante e N) e um tratamento nitrogenado (25 mg de N por vaso por semana, na forma de NH_4NO_3).

O experimento foi montado em vasos de Leonard (VICENT, 1970), em delineamento em blocos casualizados com cinco repetições. Este experimento seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente para o experimento de inoculação cruzada.

A análise de variância e o teste de Tukey a 5% de probabilidade foram executados no programa Sisvar (FERREIRA, 2011). As três variáveis número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) não foram consideradas com distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, logo tiveram seus dados transformados para raiz quadrada de (Y + 1,0).

3.3 Caracterização Molecular e Filogenética

3.3.1 Extração de DNA

As estirpes foram cultivadas em meio líquido TY (BERINGER, 1974) com incubação a 28°C, conforme o tempo de crescimento de cada isolado. Foi transferida uma alíquota de 1,5 mL da suspensão das células para microtubos de 2 mL e centrifugada a 15000 x g. Descartou-se o sobrenadante e com o precipitado foi extraído o DNA genômico seguindo o protocolo do kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, EUA) para bactérias Gram negativas.

O protocolo constitui em uma etapa inicial de lise das células a partir da adição de 600 µL *Nuclei Lysis Solution*, e incubação por 5 min. a 80 °C. Após a lise, foi adicionado 3 µL de *RNase Solution* e as amostras foram incubadas a 37 °C, por 1 h. Posteriormente, foi realizada uma etapa de limpeza com a adição de 200 µL de *Protein Precipitation Solution*, incubação das amostras em gelo por 5 min. e centrifugação a 16000 x g por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol para a precipitação do DNA e centrifugado a 16000 x g. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 600 µL de etanol a 70% e centrifugado a 16000 x g. O etanol foi aspirado e descartado e as amostras secaram em temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA foi reidratado com 100 µL de *Rehydration Solution*, e armazenado em freezer à -20°C.

3.3.2 Amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA*, *gyrB* e *nodC*

As reações de PCR foram preparadas utilizando como molde o DNA extraído das estirpes, usando o *Kit Gotaq DNA polimerase* (Promega, EUA). As reações de PCR tiveram um volume final de 35 µL contendo 1,0 µL de amostra de DNA; 1X PCR *buffer*; 1,75 mM de $MgCl_2$; 0,25 mM de dNTP; 0,20 µM de cada *primer*; 1,0 U de *Taq* DNA *Polimerase*. O volume da reação foi ajustado com água ultrapura estéril. Os *primers* e as condições de amplificação foram diferentes de acordo com os genes de interesse descritos e estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – *Primers* e condições de amplificação

Primers	Ciclo	Referência
16S rRNA **27F** 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' **1492R** 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	Desnaturação inicial a 94°C, por 3 min,; 29 ciclos de desnaturação a 94°C, 1 min.; anelamento a 58°C, 1 min.; alongamento a 72°C, 2 min.; extensão final a 72°C, 5 min.	Weisburg et al. (1991)
recA **TSrecAF** 5'-AACTGCMYTGCGTATCGAAGG-3' **TsrecAR** 5'-CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG-3'	Desnaturação inicial a 95°C, por 5 min.; 30 ciclos de desnaturação a 95°, 1 min.; anelamento a 60°C, 2 min.; alongamento a 72°C, 2 min.; extensão final a 72°C, 5 min.	Stepkowski et al. (2005)
nodC **nodC540F** 5'-TGATYGAYATGGARTAYTGGCT-3' **nodC1160R** 5'-CGYGACARCCARTCGCTRTTG-3'	Desnaturação inicial a 95°C, por 3 min.; 40 ciclos de desnaturação a 95°C, 30 seg.; anelamento a 50°C, 30 seg.; alongamento a 72°C, 1 min.; extensão final a 72°C, 7 min.	Sarita et al. (2005)
gyrB **gyrB343F** 5'-YAAGCTCGAGTACATYTGGCT-3' **gyrB1043R** 5'-TGCATGCCSGAGCCGTTCCA-3'	Desnaturação inicial a 95°C, por 5 min.; 5 ciclos de desnaturação a 94°C, 2 min.; anelamento a 58°C, 2 min.; alongamento a 72°C, 1 min.; 30 ciclos de desnaturação a 72°C, 1 min.; anelamento a 58°C, 1 min.; alongamento 72°C, 1 min.; extensão final a 72°C, 5 min.	Martens et al. (2008)

Fonte: Autora (2022).

Do produto da reação em cadeia de polimerase (PCR), uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi corada com 2 µL de tampão de corrida 6X (*Loading Buffer*) e foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose (1,5%) a 90V por 100 min., em tampão de Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X).

O tamanho dos fragmentos foi determinado utilizando o marcador molecular *Low Mass Ladder* (Invitrogen®), e o gel foi corado em solução de Brometo de Etídeo e fotodocumentado pelo fotodocumentador *L-Pix Imagem* (Loccus Biotecnologia).

O produto de PCR foi quantificado utilizando o Fluorômetro *Invitrogen Qubit* (Thermo Fisher). As reações tiveram um volume final de 200 µL, contendo 199 µL de solução (tampão e fluróforo) e 1 µL de produto de PCR. Os tubos contendo os padrões para a quantificação receberam 10 µL de padrão Qubit e 190 µL de solução. Em geral, são necessários de 20 a 100 ng/ µL de DNA para que as amostras sejam sequenciadas.

A purificação do produto de PCR foi realizada pela combinação de duas enzimas: Fosfatase Alcalina Termossensível (FastAP), que degrada os nucleotídeos não incorporados e

a Exonuclease I (EXO), que degrada *primers* residuais e demais produtos simples fita não desejáveis.

O mix de purificação foi preparado com 10 µL de DNA amplificado, 0,3 µL de EXO, 0,7 µL de FastAP e 0,5 µL de água de PCR, para cada amostra a ser sequenciada. Após o preparo, o mix foi incubado em um termociclador a 37°C por 15 min., e aquecido a 80°C por 20 min., para a inativação das enzimas.

A reação de sequenciamento foi preparada em uma placa contendo 96 poços, onde cada poço recebeu uma amostra diferente, em duas repetições, uma para o *primer foward* e outra para o *primer reverse*. Foi utilizado o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, EUA), com os seguintes reagentes e volumes: 1 µL de *primer* (5 µM), 1,5 µL de tampão da reação, 1,0 µL de *Big Dye*, água de PCR e DNA da amostra. O volume do DNA variou de 1 µL a 5,5 µL, de acordo com a concentração de DNA presente em cada amostra, e o volume da água completou o volume final de 10 µL da reação.

A placa de sequenciamento foi levada ao termociclador com a seguinte condição: desnaturação inicial a 96°C por 1 min., 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 seg., anelamento a 50°C por 15 seg. e extensão final a 60°C por 4 min. Posterior a esta etapa, foi realizada uma precipitação com Etanol, EDTA e Acetato de Sódio, e a placa foi sequenciada no sequenciador automático de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems, EUA), do Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia.

As sequências da fita senso e reversa foram utilizadas para a montagem dos *contigs*, por meio do *software Bionumerics* versão 7.0 (Applied Maths, EUA). Para garantir a qualidade da montagem, as regiões de baixa qualidade foram removidas e cada *contig* foi avaliado individualmente. A fim de verificar a similaridade das sequências obtidas com as sequências de estirpe tipo (*type strain*) depositadas no banco de dados público do *Nacional Center for Biotecnology Information GenBank®* – NCBI foi utilizado o algoritmo *Basic Local Alignment Tool* – BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

3.3.3 Análises filogenéticas

Os alinhamentos foram realizados com a ferramenta *muscle* dentro do programa MEGA 11, posteriormente foram geradas árvores filogenéticas para cada gene, utilizando as sequências obtidas neste estudo juntamente com as sequências das estirpes de referência obtidas no NCBI *GenBank®*. As distâncias foram calculadas de acordo com o modelo de Tamura 3 parâmetros (TAMURA, 1992) e as árvores filogenéticas foram inferidas usando o método de vizinhança (SAITOU & NEI, 1987). A confiabilidade do agrupamento dos clados formados nas árvores foi calculado pela análise de amostragem *bootstrap* (SWOFFORD et al., 1996), garantindo o suporte estatístico para os dados obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento de Inoculação Cruzada em Casa de Vegetação

Nos tratamentos que não receberam inoculação (controle absoluto sem inoculação e nitrogênio, e nitrogenado) não ocorreu a formação de nódulos nas raízes, indicando que não houve contaminação no experimento, permitindo confirmar a capacidade de nodulação das estirpes nos demais tratamentos.

Das 30 estirpes que haviam sido isoladas do feijão-caupi, 20 induziram nodulação no feijão-caupi e as outras 10 não nodularam esta espécie. Nenhum dos isolados de feijão-caupi induziu nodulação na cultura da soja. Das 20 estirpes isoladas da soja, 11 nodularam a soja e o feijão-caupi, e 9 não induziram formação de nódulos em nenhuma das culturas. Ao total foi observado que 31 estirpes nodularam o feijão-caupi e 11 nodularam a soja, sendo que todas as estirpes que induziram nodulação em soja também o fizeram para o feijão-caupi (Tabela 3).

Tabela 3 – Capacidade de indução de nodulação em feijão-caupi e soja por estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas destes hospedeiros em experimento de inoculação cruzada

Estirpes obtidas de feijão-caupi	Nodulação no experimento de inoculação cruzada		Estirpes obtidas de Soja	Nodulação no experimento de inoculação cruzada	
	Feijão-caupi	Soja		Feijão-caupi	Soja
BR 10734	+	-	BR 13891	+	+
BR 10736	+	-	BR 13892	+	+
BR 10737	+	-	BR 13895	+	+
BR 10739	+	-	BR 13916	+	+
BR 10740	+	-	BR 13917	+	+
BR 10742	+	-	BR 13971	+	+
BR 10745	+	-	BR 13973	+	+
BR 10748	+	-	BR 13984	+	+
BR 10749	+	-	BR 13986	+	+
BR 10750	+	-	BR 13996	+	+
BR 10756	+	-	BR 13998	+	+
BR 10758	+	-	BR 13893	-	-
BR 10760	+	-	BR 13894	-	-
BR 10778	+	-	BR 13918	-	-
BR 10779	+	-	BR 13956	-	-
BR 10780	+	-	BR 13970	-	-
BR 10925	+	-	BR 13974	-	-
BR 10941	+	-	BR 13985	-	-
BR 12537	+	-	BR 13997	-	-
BR 12538	+	-	BR 14157	-	-
BR 10733	-	-			
BR 10735	-	-			
BR 10738	-	-			
BR 10741	-	-			
BR 10744	-	-			
BR 10746	-	-			
BR 10757	-	-			
BR 10759	-	-			
BR 10926	-	-			
BR 10983	-	-			

Fonte: Autora (2023).

Os tratamentos inoculados com as estirpes BR 10778, BR 10780 e BR 13971 apresentaram as médias do número de nódulos (NN) bem expressivas, assim como as médias

da massa seca dos nódulos (MSN) maiores que as observadas nos outros isolados (Tabela 4). Segundo Araújo et al. (2007), o número de nódulos e a massa seca dos nódulos são bons indicativos de nodulação, sendo a MSN um atributo mais viável para avaliação da nodulação devido a melhor correlação com o desempenho da relação simbiótica.

Os tratamentos BR 10745, BR 10749, BR 10779 e BR 13916 apresentaram o menor número de nódulos e consequentemente a menor massa seca dos nódulos, indicando uma menor eficiência em fixar N. Segundo Xavier et al. (2007), plantas com um número maior de nódulos e da massa seca dos nódulos fixam mais N. Entretanto Hansen et al. (1993) sugerem que essa correlação não é linear, e por isso não há a necessidade de um grande número de nódulos, mas sim nódulos maiores e com maior eficiência relativa.

As estirpes que nodularam o feijão-caupi contribuíram para o crescimento das plantas, que apresentaram a massa seca da parte aérea (MSPA) maior que a do tratamento sem inoculação e sem nitrogênio (Tabela 4), com exceção das estirpes BR 10740 e BR 10745 que apresentaram a MSPA menor que a do tratamento absoluto, além de possuírem as médias do número de nódulos (NN), entre as mais baixas (Tabela 4).

Também observou-se que os tratamentos BR 10737, BR 10750, BR 10778, BR 10780 e BR 13971 proporcionaram produção de MSPA superior ao tratamento nitrogenado (Tabela 4). Os resultados encontrados neste experimento corroboram aos encontrados por Zilli (2001), Zilli et al. (2008) e Gualter et al. (2007), quando foi avaliada a eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* em fixar nitrogênio e a capacidade de formar nódulos em experimentos de casa de vegetação e campo.

De acordo com Hungria & Bohrer (2000), existe uma correlação positiva entre a massa dos nódulos e a matéria seca da parte aérea. Neste sentido, os tratamentos BR 10737, BR 10739, BR 10750, BR 10756, BR 10778, BR 10780, BR 10925, BR 13971, BR 13973 e BR 13984 mostraram melhor desempenho simbiótico com o feijão-caupi, com médias próximas ou superiores às observadas nos demais tratamentos, inclusive ao tratamento nitrogenado, quando comparada a MSPA.

No experimento de autenticação de nodulação com inoculação cruzada foi observado que o feijão-caupi nodulou tanto com as estirpes isoladas do feijão-caupi quanto as isoladas de soja, demonstrando uma baixa especificidade de nodulação. Esta característica pode limitar o uso de inoculantes em sistemas agrícolas devido a nodulação espontânea e a competição entre a estirpe inoculada a as bactérias já presentes no solo (FENING & DANSO, 2002; XAVIER et al., 2007). Ao contrário, a soja se mostrou muito mais restritiva a nodulação, estabelecendo simbiose apenas com um grupo de bactérias isoladas desta espécie e não com as do feijão-caupi.

Tabela 4 – Nodulação e matéria seca da parte aérea de plantas de feijão-caupi e soja em experimento de autenticação de nodulação com inoculação cruzada com estirpes de rizóbios isoladas deste hospedeiros

	Feijão-caupi			Soja		
Tratamentos	**NN (Nódulos por planta^{-1})**	**MSN (mg planta^{-1})**	**MSPA (g planta^{-1})**	**NN (Nódulos por planta^{-1})**	**MSN (mg planta^{-1})**	**MSPA (g planta^{-1})**
Controle	-	-	0,52	-	-	0,53
Nitrogenado	-	-	3,72	-	-	7,15
BR 10734	95	253,0	3,37	-	-	-
BR 10736	62	202,0	2,82	-	-	-
BR 10737	92	235,0	4,62	-	-	-
BR 10739	76	229,0	3,13	-	-	-
BR 10740	47	94,0	0,24	-	-	-
BR 10742	44	124,0	1,63	-	-	-
BR 10745	15	26,0	0,51	-	-	-
BR 10748	42	151,0	2,41	-	-	-
BR 10749	21	9,0	2,70	-	-	-
BR 10750	45	139,0	4,60	-	-	-
BR 10756	70	272,0	3,63	-	-	-
BR 10758	83	215,0	2,73	-	-	-
BR 10760	49	13,0	1,57	-	-	-
BR 10778	104	363,0	3,80	-	-	-
BR 10779	12	59,0	0,90	-	-	-
BR 10780	116	416,0	4,35	-	-	-
BR 10925	77	269,0	3,47	-	-	-
BR 10941	81	212,0	2,40	-	-	-
BR 12537	61	135,0	2,45	-	-	-
BR 12538	86	263,0	2,10	-	-	-
BR 13891	51	279,0	2,40	39	104,0	1,36
BR 13892	87	158,0	1,52	39	224,0	1,11
BR 13895	61	168,0	1,85	45	346,0	1,35
BR 13916	24	105,0	0,90	21	93,0	0,87
BR 13917	89	273,0	1,23	41	199,0	1,32
BR 13971	97	403,0	4,99	37	8,0	1,20
BR 13973	109	354,0	2,81	49	430,0	1,22
BR 13984	98	345,0	3,44	32	137,0	0,77
BR 13986	96	259,0	2,31	47	193,0	1,74
BR 13996	31	139,0	1,22	9	42,0	0,66
BR 13998	58	166,0	2,00	29	209,0	2,00

Fonte: Autora (2023).

A fim de saber se os tratamentos são de fato eficientes em fixar o N em quantidade requerida pela planta, conduziu-se um novo experimento para avaliação da eficiência simbiótica em comparação com a estirpe BR 3262 recomendada pelo MAPA para inoculação do feijão-caupi.

Para o experimento de eficiência simbiótica da inoculação do feijão-caupi foram escolhidas as bactérias BR 10737 e BR 13971, a fim de comparar se os resultados apresentados (número de nódulos, massa seca dos nódulos e massa seca da parte aérea) são iguais ou superiores aos observados na estirpe recomendada para esta cultura. Estas estirpes foram escolhidas pois apresentaram as melhores médias e cada uma foi isolada de cultivares diferentes, sendo a BR 10737 isolada do feijão-caupi e a BR 13971 da soja. Para a escolha também foi considerada a aparência das plantas ao final do experimento, estas apresentavam um bom crescimento, com as folhas grandes e bem verdes, indicando que estavam saudáveis e bem nutridas.

Para a cultura da soja, as estirpes BR 13895, BR 13973 e BR 13986 apresentaram a maior quantidade de nódulos entre todos os tratamentos e também a maior massa seca dos nódulos, com exceção do tratamento BR 13986 que teve uma MSN menor quando comparada com outros tratamentos (Tabela 4).

A média do número dos nódulos foi superior a 20 nódulos por planta, com exceção da BR 13996 que teve apenas 9 nódulos. Este resultado corrobora com o encontrado por Zilli et al. (2010a), ao avaliar os benefícios da inoculação em pré-semeadura para a cultura da soja. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que a massa seca dos nódulos dos tratamentos foram superiores a 200 mg por planta, porém isto não foi observado neste experimento, visto que os tratamentos BR 13891, BR 13916, BR 13917, BR 13971, BR 13984, BR 13986 e BR 13996 apresentaram a MNS menor que este valor (Tabela 4).

Segundo Hungria; Mendes (2007) a quantidade de nódulos que variaram de 15 a 30 e a massa seca dos nódulos entre 100 e 200 mg são valores que corroboram com a eficiente absorção de N necessário para o pleno desenvolvimento da soja. E isto foi observado neste experimento, dentre as 11 estirpes que nodularam a soja, oito apresentaram o NN acima de 15 e a MSN acima de 100 mg (Tabela 4). De acordo com Puldeko; Madrzak (2004) um bom indicador para avaliação da nodulação é a massa seca dos nódulos, pois plantas com baixa MSN podem diminuir em até 25% o acúmulo de nitrogênio.

Todas as estirpes que nodularam a soja apresentaram a massa seca da parte aérea maior que a do controle absoluto, que apresentou uma média 0,53 g/planta (Tabela 4). O tratamento nitrogenado obteve uma média de 7,15 g/planta, valor bem superior às médias encontradas nas estirpes inoculadas. Os resultados encontrados neste presente trabalho corroboram os encontrados por Rodríguez Rodríguez (2020), avaliando a diversidade e eficiência simbiótica de rizóbios que nodulam soja, onde o controle nitrogenado apresentou os parâmetros de biomassa superiores aos outros tratamentos.

Segundo Unkoviche & Pate (2000), o crescimento total da planta e a massa seca da parte aérea são indicadores da eficiência na FBN, pressupondo que o crescimento da planta é limitado pela disponibilidade de nitrogênio.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que a cultivar de soja utilizada apresenta uma alta especificidade, o que dificultou o estabelecimento de uma simbiose eficiente, tendo em vista que esta cultivar apresentou nódulos somente com estirpes isoladas da soja.

Para o experimento de eficiência simbiótica foram escolhidas as estirpes BR 13895 e BR 13986, que apresentaram as melhores médias para NN, MSN e MSPA. E a estirpe BR 13971, que também foi selecionada para inoculação no feijão-caupi, a fim de compará-las com a estirpe BR 29 recomendada pelo MAPA para inoculação da soja.

4.1.1 Eficiência simbiótica em casa de vegetação

No experimento conduzido em casa de vegetação, os tratamentos que não receberam inoculação (controle absoluto e controle nitrogenado) não apresentaram formação de nódulos, indicando a não contaminação do experimento.

Para a cultura do feijão-caupi, a estirpe BR 3262 (estirpe recomendada como inoculante comercial para a cultura) apresentou um valor significativamente maior para o NN, quando comparada com os demais tratamentos (Tabela 5). Os tratamentos inoculados com as estirpes BR 10737 e BR 13971 não diferiram entre si, apresentando as médias com a mesma significância.

Os tratamentos BR 10737 e BR 13971 demonstraram que não houve uma correlação direta entre o número de nódulos e massa seca de nódulos, visto que o tratamento BR 10737, apesar de ter um maior NN, demonstrou a menor MSN. A quantidade de nódulos é um bom indicativo para a eficiência simbiótica, porém esta variável não pode ser analisada de forma isolada, visto que há formação de muitos nódulos reduzidos e/ou ineficazes, resultando uma menor eficiência em fixar o N (CARDOSO et al., 2009; FONSECA et al., 2013). Além disso, não há clareza acerca do número mínimo de nódulos em feijão-caupi necessários para uma boa eficiência, como é demonstrado em soja, para a qual sabe-se que de 15 a 20 nódulos na coroa da raiz principal já são considerados suficientes (CARDOSO et al., 2009).

Segundo de Brito Ferreira et al. (2011), uma maior massa seca de nódulos em plantas inoculadas é um atributo relevante em bactérias que possam vir a ser recomendadas como inoculantes, visto que a manutenção da nodulação durante a fase reprodutiva pode resultar no aumento da produtividade. Neste sentido, o tratamento BR 3262 apresentou um valor significativamente superior aos demais tratamentos, ratificando o seu uso como estirpe recomendada para inoculação no feijão-caupi.

Os tratamentos BR 10737 e BR 13971 apresentaram médias da MSN superiores ao controle absoluto e inferior ao tratamento com a BR 3262 (Tabela 5). Estes dois tratamentos, BR 10737 e BR 13971, apresentaram as médias menores a 0,200 g por planta, ou seja, inferior aos valores encontrados em plantas inoculadas com estirpes de referência (Hungria; Mendes, 2007). O tratamento BR 10737 teve uma média de MSN aproximadamente 3 vezes menor que a da estirpe recomendada, e o tratamento BR 13971 teve aproximadamente uma média 2 vezes menor que o da BR 3262.

Para a variável massa seca da parte aérea, o tratamento nitrogenado apresentou média significativamente superior aos demais tratamentos (Tabela 5), o que corrobora aos encontrados por Pelegrin et al. (2009), avaliando a resposta do feijoeiro à inoculação com rizóbios. Possivelmente isso ocorreu devido à rápida disponibilidade de nutrientes que os adubos minerais proporcionam quando comparados a FBN, cujo processo de assimilação do N tem o início lento.

Ferreira et al. (2005) relatam que o suprimento de nitrogênio afeta diretamente a folha e suas atividades como órgão vegetativo, isto pode explicar o fato de ter ocorrido diferença entre a adubação mineral e a inoculação, visto que os tratamentos inoculados não receberam doses de N.

Quanto aos demais tratamentos avaliados, a BR 3262 apresentou a média da massa seca da parte aérea superior ao controle absoluto e aos tratamentos BR 10737 e BR 13971. Da Costa et al. (2014) também demonstraram esse mesmo padrão, quando avaliaram a eficiência simbiótica da estirpe BR 3262 em diferentes cultivares do feijão-caupi. Para a cultivar BRS Guariba (a mesma testada nesse estudo), a BR 3262 também promoveu produção de MSPA significativamente superior ao controle sem inoculação e N e aos demais tratamentos inoculados.

Tabela 5 – Nodulação e matéria seca de plantas de feijão-caupi e soja em experimento de eficiência simbiótica de estirpes obtidas destes dois hospedeiros

Cultura	Tratamento	NN* (Nódulos por planta)	MSN* (mg planta^{-1})	MSPA* (g planta^{-1})
Feijão-caupi	Controle Absoluto	0,0 c	0,0 c	1,222 c
	Controle Nitrogenado	0,0 c	0,0 c	3,512 a
	BR 3262	100,2 a	218,0 a	2,304 b
	BR 10737	50,8 b	68,0 b	1,270 c
	BR 13971	31,6 b	80,0 b	1,508 c
	CV%	**18,28**	**0,95**	**2,90**
Soja	Controle Absoluto	0,0 d	0,0 c	1,278 c
	Controle nitrogenado	0,0 d	0,0 c	3,346 a
	BR 29	102,0 a	204,0 a	1,816 b
	BR 13895	35,8 c	90,0 b	1,566 bc
	BR 13971	48,4 bc	98,0 b	1,568 bc
	BR 13986	67,8 b	172,0 a	1,606 b
	CV%	**13,69**	**1,53**	**2,84**

NN: número de nódulos; MSN: massa seca de nódulos; MSPA: massa seca da parte aérea; Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. *Dados transformados para raiz quadrada de (Y + 1,0).

Fonte: Autora (2023).

Comparando os resultados do primeiro e do segundo experimento para os tratamentos BR 10737 e BR 13971, observou-se que houve uma grande redução nas médias das variáveis NN, MSN e MSPA (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação entre as médias do primeiro e segundo experimento para feijão-caupi

Tratamentos	1° Experimento			2° Experimento		
	NN (nódulos por planta)	MSN (mg planta^{-1})	MSPA (g planta^{-1})	NN (nódulos por planta)	MSN (mg planta^{-1})	MSPA (g planta^{-1})
BR 10737	92	235,0	4,62	50,8	68,0	1,270
BR 13971	97	403,0	4,99	31,6	80,0	1,508

Fonte: Autora (2023).

Apesar dos experimentos terem seguido a mesma metodologia, alguns fatores devem ter sido importantes para essa diferença. A primeira hipótese é de que no período em que foi realizado o primeiro experimento a época era mais propícia para o cultivo do feijão-caupi.

O feijão-caupi é uma cultura de ciclo curto, sendo mais sensível às variações das condições ambientais. O bom desenvolvimento do feijão-caupi ocorre na faixa de temperatura de 18 °C a 34 °C, sendo a faixa de 18 °C a 24 °C considerada ótima (VIEIRA, 1967). As

elevadas temperaturas durante o transcorrer do dia prejudicam o crescimento e desenvolvimento da planta e limitam a FBN, visto que podem afetar a atividade fisiológica dos rizóbios e sua sobrevivência.

No primeiro experimento, que ocorreu entre os meses de março a maio de 2022, as temperaturas foram mais baixas, o que permitiu o pleno desenvolvimento da cultura. No segundo experimento, entre os meses de outubro a novembro de 2022, as temperaturas foram mais elevadas e parecem ter afetado o desenvolvimento das plantas.

Segundo Stamford et al. (1990) o estresse hídrico e térmico reduz o peso dos nódulos, o nitrogênio acumulado e a produção de matéria seca da parte aérea do feijão-caupi. Além de afetar a eficiência simbiótica de nitrogênio nas leguminosas (COSTA et al., 1996).

Outra hipótese para a grande variação observada entre as médias, seria a concentração inicial dos inóculos. A concentração de células viáveis é fundamental para o bom desempenho da inoculação. A dosagem mínima recomendada para inoculação é de 8 x 10^5 células de rizóbios por semente (MAPA, 2010). Em um trabalho avaliando a taxa de inóculo na habilidade competitiva de rizóbios e eficiência na fixação do N_2 em feijão-caupi, Silva et al. (2012) observou que ao utilizar a dose mínima recomendada pelo MAPA, ocorreu um aumento de 75 % na quantidade de nódulos por planta em relação a menor quantidade de dose aplicada (6,65 x 10^3 células de rizóbio por semente). Contudo, nos dois experimentos as plantas foram inoculadas com o caldo bacteriano crescido por quatro dias, o que seguramente forneceu *Bradyrhizobium* em quantidade superior a 10^5 porém não foi realizada a contagem de células especificamente.

Apesar da inoculação com as estirpes BR 10737 e BR 13971 não proporcionar médias significativas para NN, MSN e MSPA no experimento de eficiência simbiótica, é importante a realização de novos estudos a fim de encontrar outras estirpes que sejam eficientes e possam vir a ser recomendadas como inoculantes. Essa técnica de inoculação deve ser priorizada na agricultura brasileira, visto a importância para o estabelecimento de bactérias com potencial de FBN e o seu baixo custo de realização.

Para a cultura da soja, a estirpe BR 29 (estirpe recomendada como inoculante comercial para soja) apresentou um valor significativamente maior para o NN, quando comparada com os outros tratamentos (Tabela 5). O tratamento BR 13986 apresentou um valor significantemente maior que o tratamento BR 13971 e BR 13895, que apresentaram médias próximas.

Quanto à massa seca de nódulos, os tratamentos BR 29 e BR 13986 não diferiram significativamente entre si, isto demonstra que a estirpe BR 13986 teve um bom desempenho semelhante ao da estirpe de referência. Este resultado corrobora ao encontrado por Chibeba (2016), ao identificar e caracterizar estirpes com potencial para serem incluídas em formulações de inoculante de soja.

Este resultado indica uma nodulação satisfatória, uma vez que a inoculação com a BR 13986 resultou em uma média de 172 mg por planta, sendo que para garantir o fornecimento de N necessário para a cultura da soja, a massa de nódulos deve variar de 100 a 200 mg por planta (HUNGRIA et al., 2007).

Os tratamentos BR 13895 e BR 13971 demonstraram médias próximas para MSN, não diferindo significativamente entre si. E ainda em relação a MSN, todos os tratamentos demonstraram que houve uma correlação linear entre NN e MSN, visto que os tratamentos com maior NN também apresentaram a maior média de MSN.

Em relação à massa seca da parte aérea das plantas de soja, foi observado que o tratamento nitrogenado apresentou a maior média, sendo superior até ao tratamento com a estirpe recomendada. Este resultado corrobora o encontrado por Zilli et al. (2010b), ao comparar a eficiência agronômica de inoculantes líquido e turfoso para a cultura da soja.

Os tratamentos BR 29 e BR 13986 apresentaram MSPA significativamente maiores do que as observadas para os tratamentos absoluto, BR 13895 e BR 13971 (Tabela 5). Os

tratamentos BR 13895 e BR 13971 apresentaram as médias semelhantes e significativamente maiores que a do controle absoluto.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram ao encontrado por Chibeba (2016), o autor demonstra que o tratamento nitrogenado apresentou maior MSPA do que a estirpe SEMIA 5019 (BR 29). E que esta estirpe recomendada apresentou média significativamente semelhante a outros tratamentos, indicando a possibilidade de usar outras estirpes como inoculante para soja.

Comparando os resultados do primeiro e segundo experimento para os tratamentos BR 13895, BR 13971 e BR 13986, observou-se que não ocorreu muita diferença entre as médias das variáveis NN, MNS e MSPA (Tabela 7).

O tratamento BR 13895 apresentou uma pequena redução no número de nódulos, porém para MSN, ocorreu uma redução significativa. No entanto, isto não fez com que a MSPA no segundo experimento fosse reduzida, pelo contrário, ele apresentou MSPA maior que a observada no primeiro experimento (Tabela 7).

Em relação ao tratamento BR 13971, todas as médias foram superiores no segundo experimento. Para o tratamento BR 13986, observou-se um aumento no número de nódulos, porém as médias de MSN e MSPA reduziram do primeiro para o segundo experimento (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparação entre as médias do primeiro e segundo experimento para soja

Tratamentos	1° Experimento			2° Experimento		
	NN (nódulos por planta)	**MSN (mg planta^{-1})**	**MSPA (g planta^{-1})**	**NN (nódulos por planta)**	**MSN (mg planta^{-1})**	**MSPA (g planta^{-1})**
BR 13895	45	346,0	1,35	35,8	90,0	1,566
BR 13971	37	80,0	1,20	48,4	98,0	1,568
BR 13986	47	193,0	1,74	67,8	172,0	1,606

Fonte: Autora (2023).

Os resultados encontrados neste estudo indicaram que a BR 13986 tem potencial para ser utilizada como inoculante para a cultura da soja, visto que suas médias de MNS e MSPA foram semelhantes às da estirpe recomendada BR 29, não diferindo significativamente entre si. Em vista disso, para que esta estirpe possa ser recomendada, é necessário seguir a metodologia aplicada na seleção de estirpes de acordo com as normas da RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola).

Para a seleção de estirpes eficientes na FBN são necessárias quatro etapas. A primeira é realizada em condições laboratoriais; a segunda em condições estéreis, em casa de vegetação utilizando os vasos de "Leonard"; a terceira consiste em experimentos em casa de vegetação, em condições não estéreis, baseando-se nos resultados encontrados na etapa anterior; e a quarta etapa realizada em campo, onde a estirpes selecionadas na etapa anterior são testadas em rede. Após a realização destas etapas e sendo aprovada, a estirpe passa a ser recomendada como inoculante pelo MAPA.

4.2 Análises Moleculares

4.2.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA

Após a amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, as sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se a ferramenta *muscle* do software MEGA 11 e foi criada uma árvore filogenética com base nessas sequências (Figura 1). A árvore apresentou 3 grandes clados, suportado por *bootstrap* superior a 97 %. O clado I, delimitado na figura pela cor amarela, reuniu todas as 20 estirpes provenientes do hospedeiro soja e mais 19 isolados de feijão-caupi. O clado II, delimitado na cor vermelha, agrupou cinco estirpes provenientes do feijão-caupi, que apresentavam as mesmas características morfocultural presentes na Tabela 2B. Já o clado III, delimitado pela cor azul, reuniu 6 estirpes, todas isoladas de feijão-caupi, dentre elas, algumas foram alocadas em pequenos clados contidos nos clado III, e essa divisão condiz com as características morfológicas das culturas (Tabela 8B).

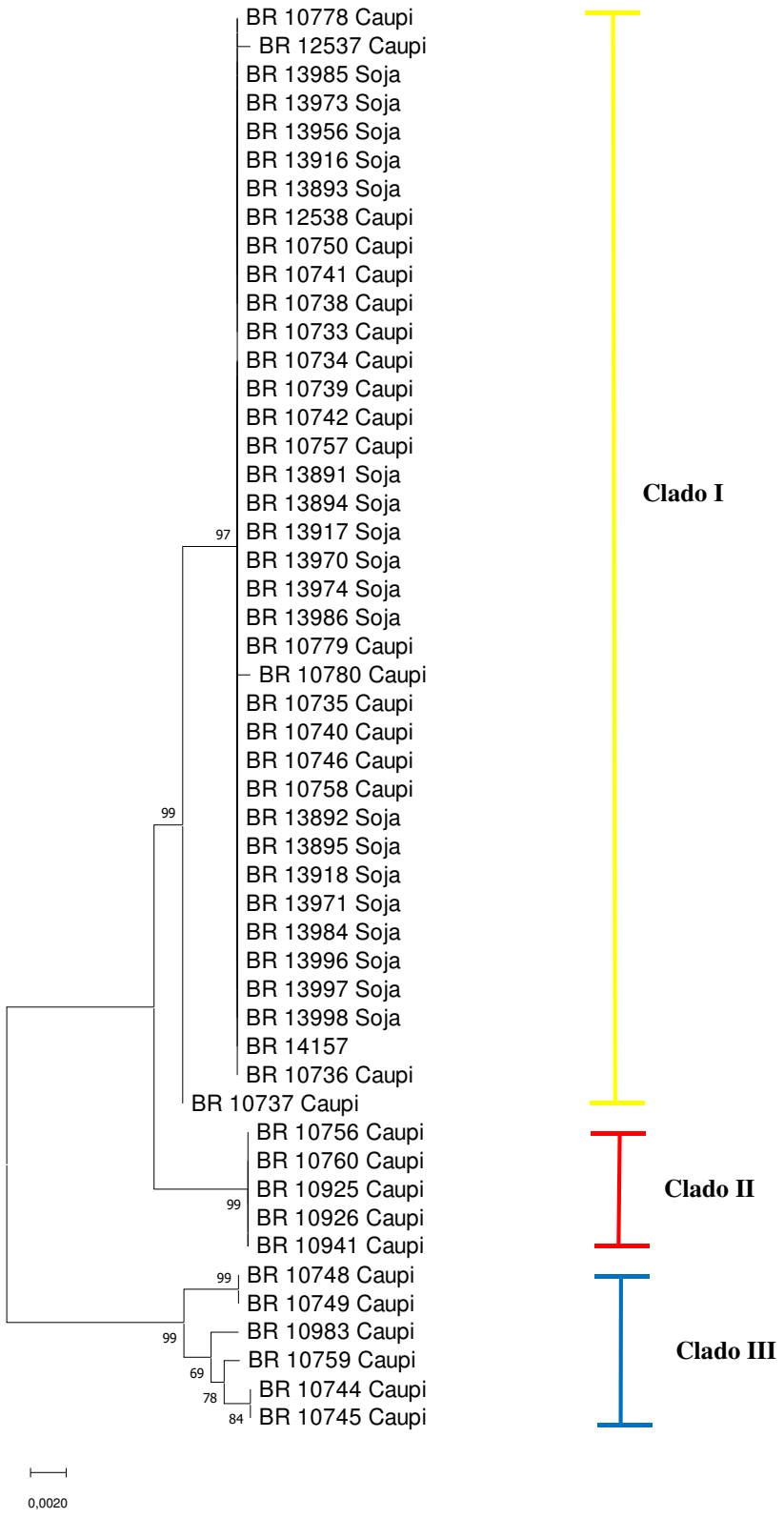

Figura 1 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros.

Posteriormente, realizou-se uma análise de agrupamento filogenético das sequências do gene 16S rRNA comparando as sequências das 50 estirpes do estudo com as sequências de estirpe tipo do gênero *Bradyrhizobium* obtidas na base de dados de nucleotídeos do NCBI. A árvore filogenética confirmou que as estirpes depositadas de fato pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, devido à alta similaridade com as sequências das estirpes tipo (Figura 2).

A primeira espécie classificada como *Bradyrhizobium* foi a *B. japonicum* (Jordan, 1982), seguida da *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992). Com base na análise do gene 16S rRNA e da homologia DNA:DNA foi demonstrado que essas duas espécies formam dois clados principais, e que as novas espécies de *Bradyrhizobium* foram sendo acomodadas dentro de um destes clados (WILLEMS et al., 2001; ORMEÑO-ORRILO et al., 2009).

Análise da diversidade genética e as relações filogenéticas do gênero *Bradyrhizobium* por meio da análise do gene 16S rRNA e filogenia Multilocus Sequence Analysis (MLSA) dos genes *atpD*, *dnaK*, *glnII* e *recA* mostraram dois grandes grupos dentro do gênero formados a partir das espécies de *B. japonicum* e B. *elkanii* e espécies descritas posteriormente a partir destas (MENNA et al., 2009). Na época do estudo indicou-se para o primeiro grupo as estirpes tipo de *B. japonicum*, *B. betae*, *B. liaoningense*, *B. canariense*, *B. yuanmingense* e *B. diazoefficiens*. E o segundo grupo formado por *B. elkanii*, *B. pachyrhizi* e *B. jicamae*.

Neste sentido, pode-se observar que apenas 6 estirpes dentre as 50 isoladas neste trabalho se posicionaram no clado da *B. japonicum* e todas foram isoladas de feijão-caupi (Figura 2). A estirpe BR 10983 foi agrupada no mesmo grupo que a estipe *B. arachidis* isolada de amendoim (WANG et al., 2013) e externo a esse grupo está a *B. huanghuaihaiense* isolada de soja (ZHANG et al., 2012) e *B. iriomotense* isolada de uma leguminosa originária de Taiwan (ISLAM et al., 2008). As estirpes *B. ingae* e *B. sacchari* formaram um grupo com bootstrap de 100 %, essa relação de proximidade entre essas espécies já havia sido observada por por alguns autores, ao descreverem novas espécies de *Bradyrhizobium* (KLEPA et al., 2022; MICLEL et al., 2020).

Os isolados BR 10744,BR 10745 e BR 10759 formaram um grupo com a espécie *B. stylosanthis* isolada de *Stylosanthes guianens* na mesma área onde foram obtidas as estirpes deste estudo na área experimental da Embrapa Agrobiologia em Seropédica (DELAMUTA et al., 2016),. As estirpes BR 10748 e BR 10749 um formaram grupo com as espécies *B. guangzhouense* e *B. guangdongense* ambos isolados de amendoim (LI et al., 2015; 2019).

Apesar destas seis estirpes estarem diretamente relacionados às cepas de referência usadas nesta análise, todos apresentaram valores de similaridade inferiores aos aceitos para indicação de que pertencem à mesma espécie. No passado era aceito que as cepas com similaridade do gene 16S rRNA acima de 97 % eram considerados da mesma espécie. Contudo, na atualidade isso não é mais aceito e, mesmo para o MLSA, alguns autores também propuseram considerar valores acima de 98 % como valor de corte (VANDAMME et al., 1996; STACKEBRANDT, 2006; STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; KONSTANTINIDIS et al., 2006).

Em relação ao clado onde se encontra a estirpe tipo de *B. elkanii*, a análise demonstrou que as estirpes BR 10941, BR 10926, BR 10925, BR 10760 e BR 10756, todas isoladas de feijão-caupi, formaram um clado que pode ser uma nova espécie de *Bradyrhizobium* por não estar diretamente relacionado às estirpes de referência usadas na análise. Esse clado se posicionou externo ao clado formado por *B. neotropicale* e *B. centrolobii*. Externos a esses dois clados estavam os isolados BR 10737 e BR 12537, que também não formaram grupo com as estirpes tipo de referência.

A estirpes tipo de referência *B. tropiciagri*, *B. pachyrhizi*, *B. elkanii*, *B. brasilense*, *B. ripae*, *B. macuxiense*, *B. ivorense* e *B. ferriligni* posssuem grande semelhança entre si e por isso formaram um único clado. Essa relação de semelhança já foi demonstradas em outros trabalhos (FOSSOU et al., 2020; MICHEL et al., 2017). Neste agrupamento foi observado que os isolados

deste presente estudo foram sendo agrupados próximos das estirpes tipo que eles tinham maior similaridade.

O isolado BR 10780 demonstrou maior similaridade com a estirpe *B. ferriligni* isolada de *Erythrophleum fordii* (Yao et al., 2015). Os isolados de feijão-caupi BR 10738, BR 10746 e BR 10779 e os isolados de soja BR 13894, BR 13956, BR 13984 e BR 13996 se agruparam com a estirpe tipo *B. ripae* isolada de leguminosas silvestres (BÜNGER et al., 2018).

A estirpe BR 13997 apresentou maior similaridade com a estirpe *B. brasilense* isolada de feijão-caupi em solos tropicais (MARTINS da COSTA et al., 2017). A estirpe tipo de referência *B. elkanii* foi a que apresentou a maior quantidade de isolados semelhantes a ela, sendo 7 isolados do feijão-caupi: BR 10735, BR 10741, BR 10758, BR 10733, BR 10739, BR 10750 e BR 12538; e 7 isolados da soja; BR 13892, BR 13917, BR 13971, BR 13974, BR 13895, BR 13970 e BR 13985.

As estirpes BR 10736, BR 10742 e BR 10778, isoladas de feijão-caupi, a as estirpes BR 13893, BR 13918 e BR 14157, isoladas de soja, foram agrupadas com *B. pachyrhizi* isolada de uma leguminosa originária do México (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2009).

A estirpe tipo *B. tropiciagri* isolada de soja (DELAMUTA et al., 2015) foi agrupada com 5 isolados de soja BR 13998, BR 13986, BR 13973, BR 13916 e BR 13891, e com 3 isolados de feijão-caupi BR 10757, BR 10740 e BR 10734.

Apesar do gene 16S rRNA ser uma ferramenta amplamente utilizada na avaliação das relações filogenéticas entre bactérias, em alguns gêneros, incluindo *Bradyrhizobium*, ele é altamente conservado, o que dificulta a distinção entre as espécies estreitamente relacionadas (DELAMUTA et al., 2012; MENNA et al., 2006, 2009; WANG & MARTÍNEZ-ROMERO, 2000; LARANJO et al., 2012).

Diante disso, a fim de superar as limitações do gene 16S rRNA, são utilizados outros genes *housekeeping* com maiores taxas de evolução para fornecer mais informações sobre as relações filogenéticas entre as bactérias (AZEVEDO et al., 2015; RIVAS et al., 2009; RIBEIRO et al., 2015; GEVERS et al., 2005).

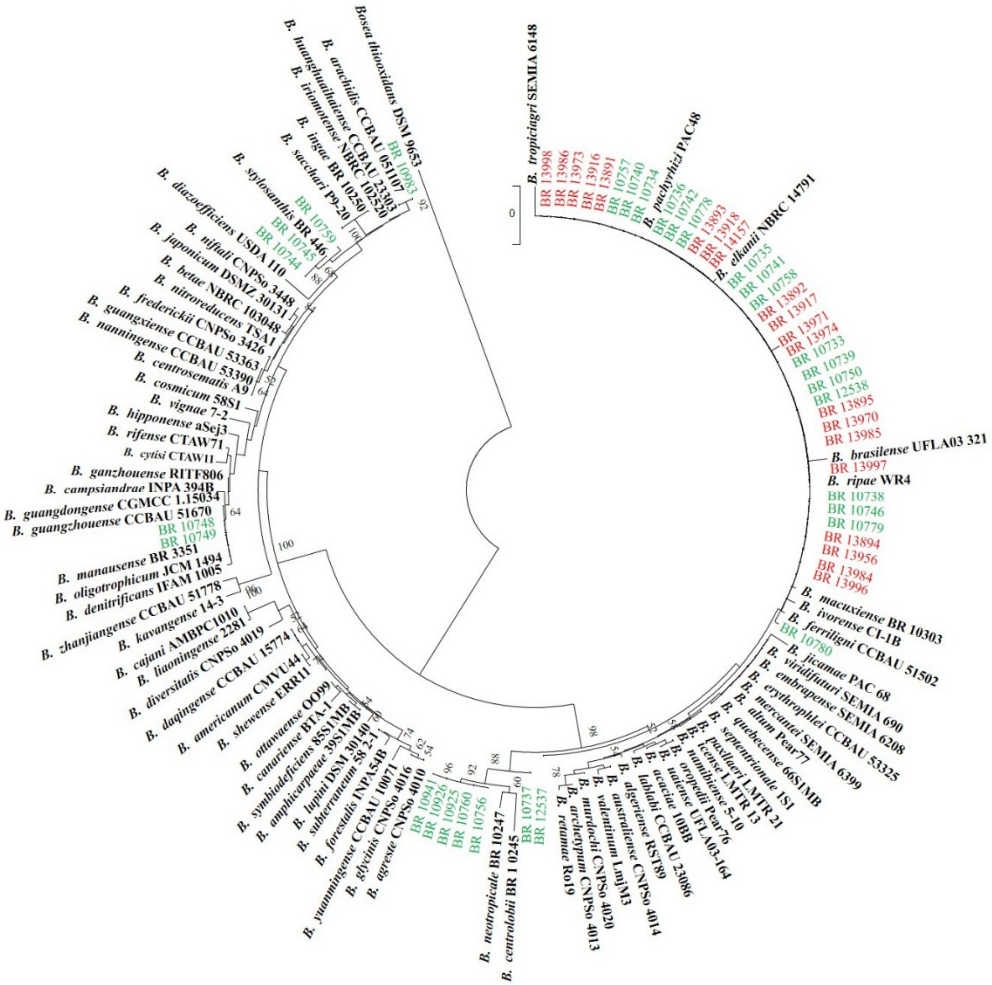

Figura 2 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros.

4.2.2 Análises filogenéticas dos genes *housekeeping recA* e *gyrB*

Os genes *recA* e *gyrB* foram avaliados a fim de verificar se as árvores formadas eram congruentes entre si, e se cada gene refletia o posicionamento das estirpes de forma similar ao observado para o 16S rRNA. Do total das 50 estirpes selecionadas para este estudo, para quatro não se obteve amplificação para o gene *gyrB*, apesar das diferentes condições de amplificações testadas, foram elas: BR 10758, BR 10779, BR 10780 e BR 10941.

A árvore filogenética construída com base nas sequências do gene *recA* (Figura 3) foi coerente com a filogenia do gene 16S rRNA, demonstrando a divisão dos dois grupos, o primeiro formado pela estirpe *B. japonicum* e o segundo pela *B. elkanii* e a distribuição das estirpes isoladas do feijão-caupi e da soja dentro destes dois grupos. Porém, alguns isolados se reorganizaram em clados distintos do que foi observado na árvore filogenética do gene 16S.

No clado de *B. japonicum*, a estirpe BR 10983 e BR 10759 formou um grupo com a *B. arachidis* e *B. stylosanthis*, com similaridade acima de 98%, o que demanda uma análise mais aprofundada para definição da espécie a qual pertencem (Figura 3 e 4). Os isolados BR 10744 e BR 10745 formaram um grupo com a espécie *B. ingae*, porém ao testar a similaridade utilizando o BLASTn, foi observado que estes isolados não apresentam uma similaridade significativa, indicando que estes isolados podem ser uma nova espécie dentro do gênero *Bradyrhizobium* (Figura 3 e 4). O mesmo aconteceu com as estirpes BR 10748 e BR 10749, que na análise do *recA* formaram clado com *B. campsiandrae*, mas não apresentaram alto valor de similaridade (Figura 3) e na filogenia do *gyrB* se agruparam com *B. zhanjiangense* (Figura 4).

Tanto a análise do *recA* quanto *gyrB* demonstrou que as estirpes BR 10926, BR 10941, BR 10925, BR 10760 e BR 10756 formaram um grupo único e que se posicionou de forma intermediária aos clados de *B. japonicum e B. elkanii* para o *recA* (Figura 3) e mais próximo, mas também distante das demais espécies do clado de *B. japonicum* para o *gyrB* (Figura 4). Curiosamente, estas estirpes mostraram alta similaridade com *B. centrolobii* e *B. neotropicale* quanto ao 16S rRNA e para ambas estas espécies foi demonstrado não haver congruência entre o 16S rRNA com genes conservados (ZILLI et al., 2014; MICHEL et al., 2016). Assim, é coerente pensar que este grupo represente uma nova espécie, o que atualmente precisa ser confirmado por estudos, como os propostos em de Lajudie et al., (2019), que inclui a análise de genomas.

No clado juntamente com a espécie de *B. elkanii*, as estirpes isoladas de feijão-caupi BR 10734, BR 10736 e a estirpe BR 10757 formaram um grupo (98 % de bootstrap) tanto para o *recA* quanto para o *gyrB*, indicando fazerem parte da mesma espécie e, possivelmente, como ao grupo mencionado anteriormente uma nova espécie. Este grupo agrupou-se próximo *B. oropedii*.

Na análise do *recA* e *gyrB*, isolados BR 13970, BR 13918, BR 13917, BR 13916, BR 13956 e BR 13986 formaram um grupo com a espécie *B. elkanii*, par apresentando valores de bootstrap de 74% e 77%, respectivamente, demonstrando que são potenciais espécies novas dentro de *B. elkanii*.

As estirpes BR 10740, BR 10733, BR 10738, BR 10739 e BR 10746 formaram um grupo, (tanto na análise do *recA* quanto *gyrB*) com a estirpe tipo de referência *B. pachyrhizi* LMG 24246^{T} isolada de nódulos efetivos de *P. erosus* na Costa Rica. Próximo a esse grupo se posicionaram as estirpes BR 10758, BR 10778, BR 10750, BR 13998, BR 12537, BR 10779, BR 10741, BR 10735, BR 10742, BR 10780, BR 13996, BR 12538 e BR 13997. Aparentemente estas estirpes formariam um grupo com espécies novas no gênero *Bradyrhizobium*, porém nesta análise dos genes *housekeeping*, foi acrescentada a estirpe BR 3262, recomendada como inoculante para feijão-caupi. Foi observado que esse grupo incluiu a BR 3262, indicando fazerem parte da mesma espécie. Recentemente esta estirpe foi caracterizada como *B.*

pachyrhizi, tendo sido isolada no município de Seropédica, mesmo local onde foram isoladas as estirpes deste estudo.

Vale mencionar que este foi o único grupo que inclui conjuntamente estirpes isoladas de feijão-caupi e soja e todas as estirpes mostraram habilidade em nodular feijão-caupi e as duas isoladas de nódulos de soja (BR 13996 e BR 13998) nodularam ambas espécies no experimento de autenticação (Tabela 4).

O grupo formado pelas estirpes BR 13891, BR 13892, BR 13893, BR 13894, BR 13895, BR 13971, BR 13973, BR 13974, BR 13984, BR 13985 e BR 14157, para ambos os genes *recA* e *gyrB*, apresentou similaridade próxima a 100% entre as estirpes, demonstrando ser um grupo coeso e possivelmente pertencentes à uma nova espécie. Este grupo se posicionou isoladamente de todas as demais estirpes tipo e reuniu apenas estirpes isoladas de nódulos de soja e mostraram habilidade em nodular ambas as espécies ou não nodularam as plantas no experimento de autenticação (Tabela 3). Este resultado é interessante, pois geralmente plantas de soja não estabelecem nodulação com rizóbios estabelecidos no solo sem que tenha sido feita uma inoculação prévia (HUNGRIA et al., 2007). Assim, estas bactérias representavam uma descoberta interessante simplesmente pelo fato de terem sido isoladas de áreas onde não havia sido realizada inoculação. Adicionalmente, o fato de terem sido isoladas estirpes que se agruparam com *B. elkanii* mostra que estirpes oriundas de inoculantes de plantios no passado também estão presentes. Atualmente são recomendadas duas estirpes de *B. elkanii*, uma de *B. japoniucum* e outra de *B. diazoefficiens*, conforme mencionado anteriormente. Ademais, este resultado também é intrigante, pois muitas das estirpes deste grupo, apesar de terem sido isoladas de nódulos, não estabeleceram nodulação nem com soja, tampouco com feijão-caupi. Assim, há uma indicação de eventos de transferência horizontal de genes que podem ter ocorrido entre estas estirpes ao longo dos anos.

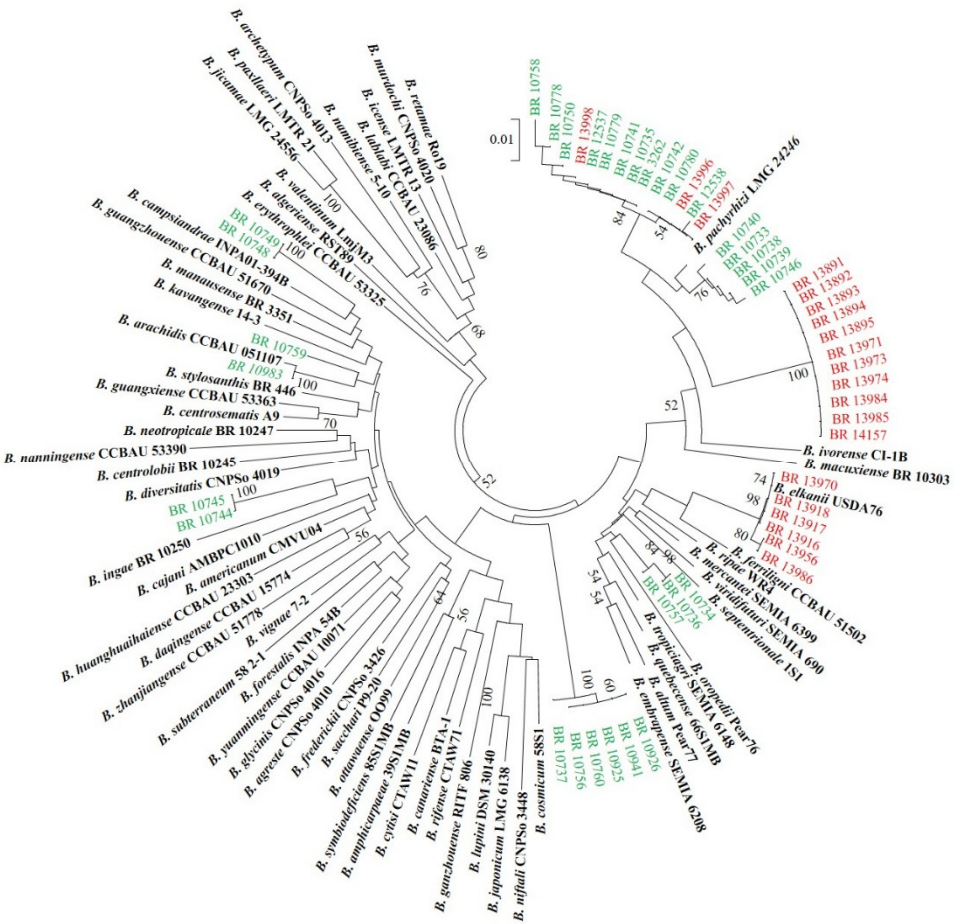

Figura 3 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *recA* das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros.

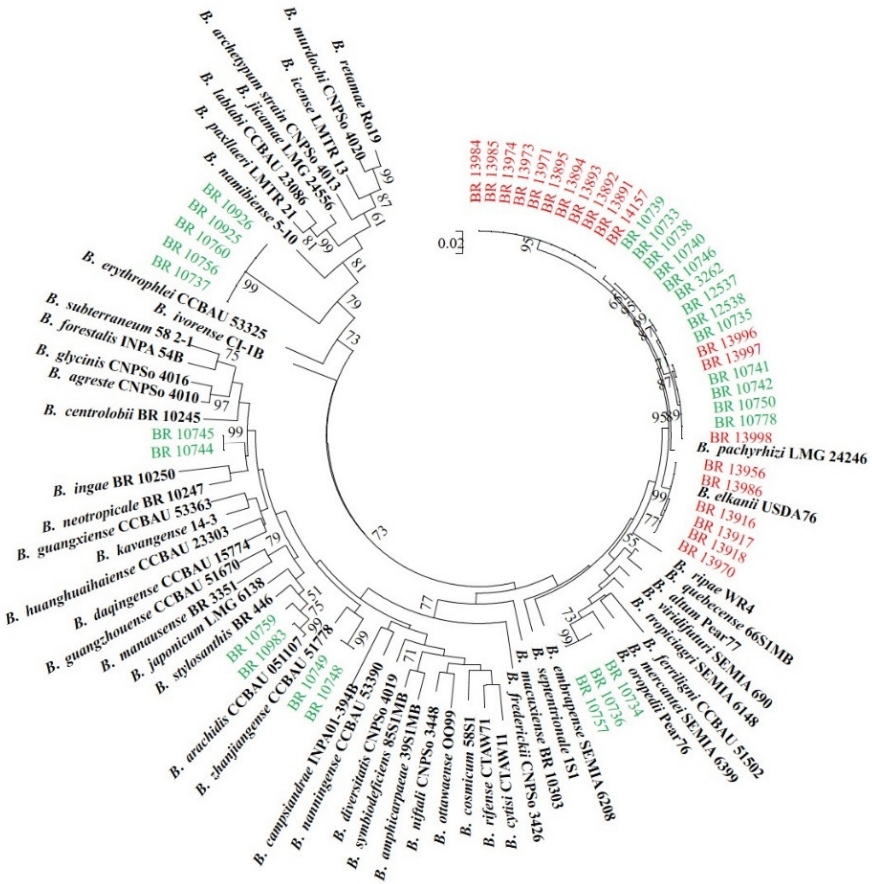

Figura 4 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gyrB* das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros.

4.2.3 Análise filogenética do gene simbiótico *nodC*

Os genes *nod* são responsáveis pela produção de quitooligossacarídeos, conhecidos como fatores *nod*, que estão diretamente envolvidos na especificidade entre plantas e bactérias (MENNA & HUNGRIA, 2011). Assim, a análise das sequências destes genes pode trazer informações relevantes sobre a especificidade de nodulação entre as leguminosas e os rizóbios.

Do total das 50 estirpes selecionadas para este estudo, para 13 não se obteve amplificação para o gene *nodC*, muito embora tenham sido utilizados diferentes pares de primers para a reação de PCR e distintas condições de amplificação. Entre as estirpes que não se obteve amplificação duas isoladas de feijão-caupi: BR 10736 e BR 10941, e onze isoladas de soja: BR 13895, BR 13916, BR 13917, BR 13918, BR 13956, BR 13970, BR 13971, BR 13973, BR 13984, BR 13985 e BR 13996. Para estas estirpes, apenas não se verificou nodulação para quatro delas que haviam sido isoladas de soja (BR 13918, BR 13956, BR 13970 e BR 13985 e as demais nodularam um ou mesmo os dois hospedeiros no experimento de autenticação (Tabela 3). Ainda outra constatação é que as estirpes para as quais não se amplificou o *nodC*, se distribuíram ao longo de diferentes grupos (genes 16S rRNA, *recA* e *gyrB*) (Figuras 2, 3 e 4). Este resultado sugere, desta forma, que o insucesso na amplificação decorre de dificuldades no ajuste das condições reações ou dos primers, mais do que uma possibilidade de diversidade da sequência dos genes *nodC*, ou mesmo a ausência deste nas estirpes. É importante mencionar que foi demonstrado que em algumas situações a nodulação pode ocorrer sem a presença dos fatores de nodulação, ou seja, sem a necessidade dos genes *nod* (FABRE et al., 2015). Isso, contudo, parece ser modulado pelo hospedeiro e ao que se conhece ocorre em algumas espécies da tribo Dalbergieae, que inclui o gênero *Arachis*, e *Sthylosanthes*.

A árvore filogenética construída com base nas sequências do gene *nodC* para as trinta e sete estirpes que obteve-se amplificação mostrou grande diversidade deste gene entre elas (Figura 5). Observa-se a distribuição das estirpes em 10 grupos diferentes e coerência parcial com os resultados obtidos a partir do gene 16S rRNA e dos genes *housekeeping*.

Um dos grupos foi formado pelas estirpes isoladas de feijão-caupi BR 10756, BR 10760, BR 10925, BR 10926 e BR 10737, tal como havia ocorrido para os genes *housekeeping* analisados, o que indica que eles devem representar uma nova espécie e com sequência do gene *nodC* distinta de outras espécies. Da mesma formas, as estirpes BR 10744 e BR 10745 formaram grupo exclusivo com *B. manausense* sendo a estirpe mais próximas, na análise do gene *nodC*, sendo um grupo exclusivo para os genes *recA* e *gyrB*, o que indica que também devam ser representar uma nova espécie e com características distintas.

Na filogenia do gene *nodC*, as estirpes BR 10746, BR 10739, BR 10740, BR 10738 e BR 10733 formaram grupo com *B. neotropicale*, diferente do que foi observado para os genes *housekeeping*, onde elas formaram grupo com *B. pachyrhizi* LMG 24246^{T}. Duas estirpes de feijão-caupi BR 10779 e BR 10735 formaram um grupo com *B. embrapense* na filogenia do *nodC*, porém nas análises do *recA* e do *gyrB*, eles formavam um grupo com BR 3262 de *B. pachyrhizi*. As estirpes BR 10741, BR 13998 e BR 10750 formaram grupo com *B. tropiciagri*, porém nas análises anteriores dos genes housekeeping, elas se agrupavam com *B. pachyrhizi* LMG 24246^{T}. As estirpes BR 13997, BR 10742, BR 10778, BR 10780, BR 12537 e BR 12538 formaram grupo com *B. pachyrhizi* BR 3262, conforme foi demonstrado para os genes 16S rRNA, *recA* e *gyrB*, indicando que este grupo faz parte da mesma espécie. Isso atesta claramente uma grande

diversidade entre as estirpes que estruturalmente estão próximas de *B. pachyrhizi*, porém em termos de genes de nodulação, são extremamente diversas.

A estirpe BR 10983 formou grupo com *B. arachidis*, conforme foi observado nas filogenias anteriores, indicando que faz parte desta espécie. As estirpes BR 10748 e BR 10749 formaram grupo externo ao grupo formado por *B. agreste* e *B. zhanjiangense*, similar ao encontrado na filogenia do gene *gyrB*, onde elas se agrupavam com *B. zhanjiangense.* Mas diferente do que foi demonstrado na filogenia do *recA*, onde se agruparam com *B. campsiandrae*.

A estirpe BR 10759 formou um grupo com a estirpe tipo *B. sacchari*, indicando serem de uma mesma espécie. Nas análises dos genes *housekeeping*, ela formava um grupo externo a BR 10983 e *B. arachidis*, porém na filogenia do 16S rRNA, ela se posicionou próximo a *B. sacchari*, o que indica que ela de fato pertence a espécie de *B. sacchari*.

As estirpes BR 10758 e BR 13986 formaram grupo com a estirpe tipo *B. elkanii* indicando serem dessa espécie. No experimento de autenticação, a estirpe BR 10758 nodulou exclusivamente o feijão-caupi e a BR 10986 nodulou tanto soja quanto caupi (Tabela 4). Sabe-se que atualmente são recomendadas duas estirpes de *B. elkanii* para inoculação, logo essa capacidade de nodular presente nestas estirpes BR 10758 e BR 13986, deve-se ao fato delas pertencerem a essa estirpe recomendada. Inclusive no experimento de eficiência simbiótica a estirpe BR 13986 apresentou médias semelhantes às da estirpe recomendada para soja, indicando ser uma estirpe com potencial de ser utilizada como inoculante.

As estirpes isoladas de feijão-caupi BR 10734 e BR 10757 formaram um grupo, conforme foi observado para os outros genes, indicando que são da mesma espécie. Nas filogenias dos genes *housekeeping*, eles se posicionaram próximo de *B. oropedii*, porém para o gene *nodC*, ficaram próximo de *B. ferriligni.* Contudo, como dito anteriormente, este grupo apresentou baixa similaridade com as estirpes de referência, indicando que possivelmente são uma nova espécie.

As estirpes BR 13974, BR 14157, BR 13894, BR 13893, BR 13892 e BR 13891 formaram um grupo coeso, composto somente por estirpes isoladas de soja, por não estarem relacionados com nenhuma estirpe tipo de referência, possivelmente são uma nova espécie dentro do gênero *Bradyrhizobium*. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram aos encontrados por Laguerre et al. (2001), que identificaram incongruências entre o gene simbiótico *nodC* e o 16S rRNA para diferentes cepas representativas de *Rhizobium*. Alguns autores indicam que rearranjos genéticos ocorrem no curso da evolução, como por exemplo, a transferência lateral de genes que desempenha um importante papel da diversificação e na estruturação das populações de rizóbios (STEENKAMP et al., 2008; BARCELLOS et al., 2007; LAGUERRE et al., 2001).

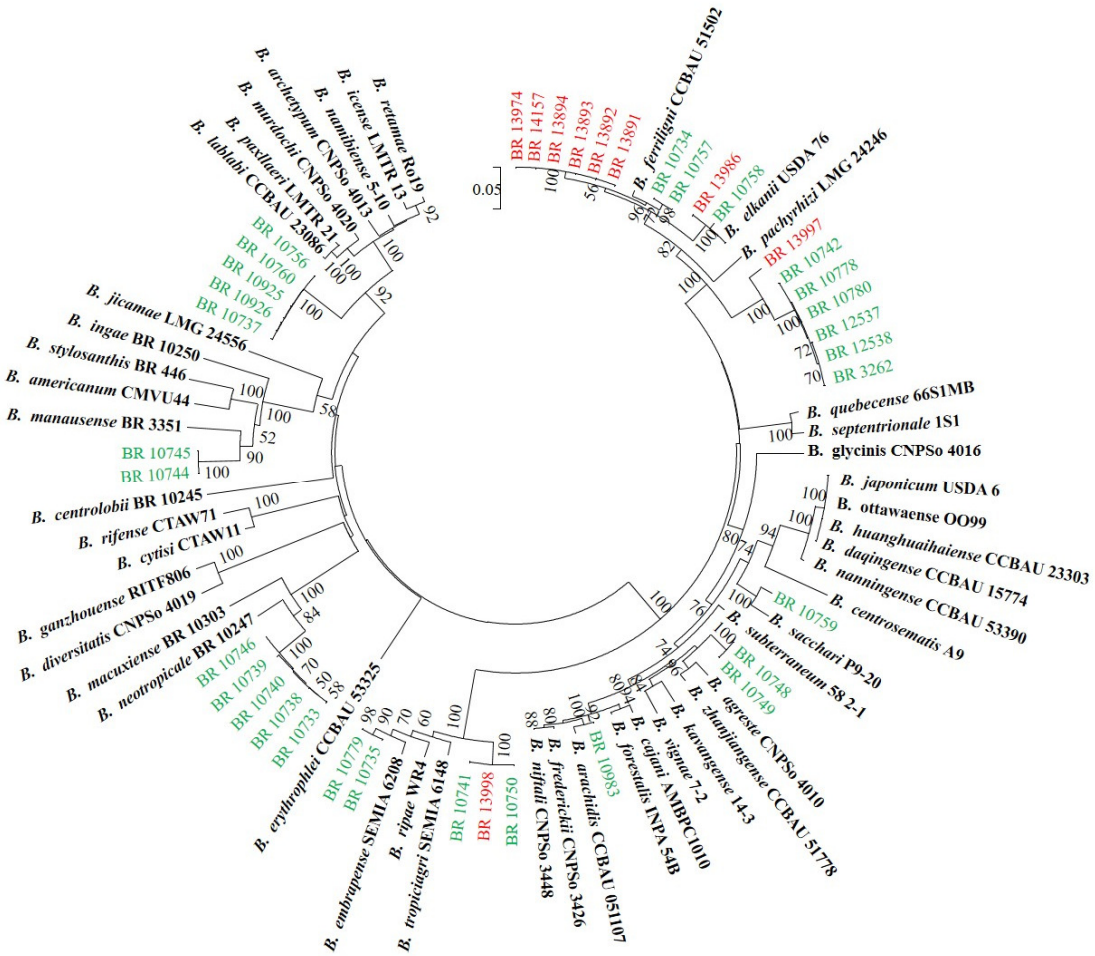

Figura 5 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *nodC* das bactérias isoladas de feijão-caupi e soja do município de Seropédica e estirpes tipos do gênero *Bradyrhizobium* obtidas do *GenBank*. O método utilizado para a construção da árvore foi o de máxima verossimilhança com 500 replicatas de bootstrap. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros.

5 CONCLUSÕES

- As estirpes BR 10737 e BR 13971 foram as mais eficientes em fixar o nitrogênio na cultura do feijão-caupi.
- As estirpes BR 13895 e BR 13986 foram as mais eficientes em fixar o nitrogênio na cultura da soja.
- Em condições estéreis no vaso Leonard, a estirpe BR 13986 favoreceu significativamente o crescimento e nodulação das plantas de soja em comparação com a estirpe recomendada BR 29.
- A partir da análise filogenética das 50 estirpes de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi e soja identificou-se que todas pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, existindo alta diversidade entre estas estirpes.
- Apesar de muitas estirpes estarem estruturalmente associadas, e filogeneticamente próximas, pelos genes 16S rRNA, *recA* e *gyrB* possuem padrões de nodulação distintos e com genes *nodC* também distintos.
- Estirpes isoladas de soja foram capazes de nodular tanto esta espécie quanto o feijão-caupi, enquanto as isoladas de feijão-caupi apenas nodularam este mesmo hospedeiro, independente da semelhança do gene *nodC*.
- Entre as estirpes há potencialmente cinco novas espécies, quatro para o feijão-caupi e uma para a soja, o que demanda um estudo taxonômico aprofundado para a confirmação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKANDE, S. R. Genotype by environment interaction for cowpea seed yield and disease reactions in the forest and derived savanna agro-ecologies of south-west Nigeria. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v. 2, n. 2, p. 163-168, 2007.

ALMEIDA, A. L. G.; DE ALCÂNTARA, R. M.; NÓBREGA, R. D. A.; NÓBREGA, J. C.; LEITE, L. F.; DA SILVA, J. A. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no **Piauí. Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, p. 364-369, 2010.

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Transformações do nitrogênio em rotações de culturas sob sistema plantio direto. In: WORKSHOP NITROGÊNIO NA SUSTENTABILIDADE DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA, 2000, Dourados, MS. **Anais...** Doutorandos: Embrapa Agropecuária Oeste; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. p. 9-31. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 26; Embrapa Agrobiologia. Documentos, 128).

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDRADE JUNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHOS, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. S.; ROCHA, M. M.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. **Cultivo de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).** Embrapa Meio-Norte. 108 p. 2002.

ARAGÃO, R. M.; SILVA, J. S.; LIMA, C. S.; SILVEIRA, J. A. G. Salinidade modula negativamente a absorção e assimilação de NO_3^- em plantas de feijão de corda. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 382-389, 2011.

ARAÚJO, F. F.; CARMONA, F. G.; TIRITAN, C. S.; CRESTE, J. E. Fixação biológica de N_2 no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 535-540, 2007.

AZEVEDO, H.; LOPES, F. M.; SILLA, P. R.; HUNGRIA, M. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. **BMC genomics**, v. 16, n. 5, p. 1-11, 2015.

AZEVEDO, H. **Base de dados para identificação taxonômica e filogenética de espécies do gênero *Bradyrhizobium* usando a metodologia de Multilocus sequence analysis**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; DA SILVA BATISTA, J. S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2635–2643, 2007.

BARRERA, L. L.; TRUJILLO, M. E.; GOODFELLOW, M.; GARCIA, F. J.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; DAVILA, G.; MARTINEZ-ROMERO, E. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus spp*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1086-1091, 1997.

BEGUM, A. A.; LEIBOVITCH, S.; MIGNER, P.; ZHANG, F. Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum bv. viceae* preincubated with naringenin and hesperetin or application of naringenin and hesperetin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p. 71-80, 2001.

BERINGER, J. E. A factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**. New York, v. 84, n. 1, p. 188-198, 1974.

BEZERRA, A. A. C.; TÁVORA, F. J. A. F.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. Morfologia e produção de grãos em linhagens modernas de feijão-caupi submetidas a diferentes densidades populacionais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p. 85-93, 2008.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. **Soja: tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ**, p. 1-18, 2000.

BODDEY, R. M.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p.407-415, 1997.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. **A soja no Brasil**, p. 1-16, 1981.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer Verlag, v. 1, 2001.

BÜNGER, W.; GRÖNEMEYER, J. L.; SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium ripae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of wild legumes in Namibia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3688-3695, 2018.

BUSSE, H.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 47, p. 33–38, 1996.

CARDOSO; J. D.; GOMES, D. F.; GOES, K. C.; JUNIOR, N. D. S. F.; DORIGO, O. F.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of peanut, soybean and common bean plants. **Soil Biol. Biochemistry**., Oxford, v. 41, n. 8, p. 1760-1763, 2009.

CARLETTI, F. M**y voyage around the world**. Pantheon Books, 1964.

CARVALHO, F. G. de; SELBACH, P. A.; BIZARRO, M. J. Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium spp* recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 883-891, 2005.

CARVALHO, F. G.de; SELBACH, P. A.; SILVA, A. J. N. da. Especificidade hospedeira de variantes *Bradyrhizobium spp* em soja (cvs peking e clark), caupi e guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2701-2708, 2008.

CHAKRABARTI, S.; LEE, M. S.; GIBSON, A. H. Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, n. 5, p. 349-354, 1981.

CHIBEBA, A. M. **Caracterização de rizóbios isolados de soja em Moçambique e estratégias visando incrementar a contribuição da fixação biológica do nitrogênio**. 2016. 122 f. Tese (Doutourado) – Universidade Estadual de Londrina

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 3 terceiro levantamento, dezembro 2022. Disponível em: http://www.conab.gov.br . Acesso em: 11 de jan. 2023.

COSTA, R. C. L.; CARDOSO, B. B.; SILVA, J. T.; GOMES FILHO, J. G. F.; SILVEIRA, J. A. G.O estresse hídrico diminui intensamente a assimilação do nitrato e a nodulação em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi**, v. 4, p. 78-79, 1996.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ANDRADE, D. S.; Hungria, M. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4167-4173, 2013.

DAZZO, F. B.; NAPOLI, C. A.; HUBBEL, D. H. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rizobium* clover symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 166-171, 1976.

DA COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S.; DA SILVA, A. F.; DE FERREIRA, L.; NÓBREGA, J. C.; MOREIRA, F. M. D. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014

DAS NEVES, A. C.; CAMARA, J. D. S.; CARDOSO, M.; da SILVA, P. H. S.; ATHAYDE SOBRINHO, C. Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar. **Embrapa Meio-Norte-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.

DE BRITO FERREIRA, E. P.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e produção de grãos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculado com isolados de rizóbio. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 27-35, 2011.

DE LAJUDIE, P. M.; ANDREWS, M.; ARDLEY, J.; EARDLY, B.; JUMAS-BILAK, E.; Kuzmanović, N.; YOUNG, P. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 69, n. 7, p. 1852-1863, 2019.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; Hungria, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 698-710, 2012.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; PARMA, M. M.; MELO, I. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4424-4433, 2015.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ARAÚJO, J. L. S.; ROUWS, L. F. M.; ZILLI, J. É.; PARMA, M. M.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes spp*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3078-3087, 2016.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

EMBRAPA MEIO NORTE. **Cultivo do feijão-caupi.** Sistemas de Produção, 2. Versão Eletrônica. 2003. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br. Acesso em: 01 de nov. 2022.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números (safra 2018/19)**. Disponível em: https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos. Acesso em 23 de fev. 2022.

FABRE, S.; GULLY, D.; POITOUT, A.; PATREL, D.; ARRIGHI, J. F.; GIRAUD, E.; CARTIEAUX, F. Nod factor-independent nodulation in *Aeschynomene evenia* required the common plant-microbe symbiotic toolkit. **Plant Physiology**, v. 169, n. 4, p. 2654-2664, 2015.

FAOSTAT – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#data . Acesso em 23 de fev. de 2022.

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v. 79, n. 2-3, p. 139-152, 2002.

FERREIRA, O. E.; BELTRÃO, N. E. D. M.; KONIG, A. Efeitos da aplicação de água residuária e nitrogênio sobre o crescimento e produção do algodão herbáceo. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.9, n.1-3, p.893-902, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia – UFLA**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FONSECA, G. G.; OLIVEIRA, D. P.; SOARES, B. L.; FERREIRA, P. A. A.; TEIXEIRA, C. M.; MARTINS, F. A. D.; MOREIRA, F. M. de S.; ANDRADE, M. J. B.

Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Jounal**, Uberlândia, v. 29, n. 6, p. 1778-1787, 2013.

FOSSOU, R. K.; POTHIER, J. F.; ZÉZÉ, A.; & PERRET, X. *Bradyrhizobium ivorense* sp. nov. as a potential local bioinoculant for *Cajanus cajan* cultures in Côte d'Ivoire. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1421, 2020.

FRED, E. B.; WAKSMAN S.A. Yeast extract-manitol agar for laboratory manual of general microbiology. **New York: McGraw**, 1928.

FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M.M.; RIBEIRO, V.Q.; LOPES, A.C.A. Adaptabilidade e estabilidade produtiva de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v. 35, p. 24-30, 2005.

FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M.M.; RIBEIRO, V.Q.; SITTOLIN, I.M. 2009. Avanços e perspectivas para a cultura do feijão-caupi. In: Albuquerque; A.C.S.; Silva; A.G. (Ed.). **Agricultura Tropical:** quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 235-250.

FREIRE, J. R. J.; VIDOR, C. Rizobiologia. Estudos no Estado do Rio Grande do Sul. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). A soja no Brasil. Campinas: ITAL, 1981. p. 417-425.

FREITAS, M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, 2011.

GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. **A saga da soja:** de 1050 aC a 2050 dC. 2018.

GEVERS, D.,; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GILIOLI, J. L., F. TERASAWA, W. WILLEMANN, O. P. ARTIAGA, E. A. V. MOURA & W. V. PEREIRA. Soja: Série 100. FTSementes, Cristalina, Goiás. (**Boletim Técnico 3**), 18 p. 1995.

GRUZMAN, I; DOBEREINER, J. IN: **Anais da IV reunião latino americana sobre inoculantes para leguminosas**. Porto Alegre, p. 84, 1968.

GUALTER, R.M.R.; LEITE, L.F.C.; ALCÂNTARA, R.M.; CARDOSO M.; COSTA, D.B.; LIMA, S.S. Avaliação dos efeitos da inoculação de feijãocaupi (Vigna unguiculata [L.] Walp.) com *Bradyrhizobium elkanii*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.637-640, 2007.

HANSEN, A. P.; YONEYAMA, T.; KOUCHI, H.; MARTIN, P. Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico and a supernodulating mutant. 1. Growth, mineral-composition and effect of sink removal. **Planta**, v. 189, n. 4, p. 538-545, 1993.

HASSE, G.; BUENO, F. **O Brasil da Soja.** Abrindo Fronteiras, Semeando Cidades. 1996.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

HIRSCH, A. M.; LUM, M. R.; DOWNIE, J. A. What makes the rhizobia– legume symbiosis so special? **Plant Phisiology**, Rockville, v. 127, p. 1484–1492, 2001.

HOFFMANN, L. V. Biologia molecular da fixação biológica do nitrogênio. **Instituto agronômico. Campinas SP**, 2007.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, n. 1, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N2 fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. & MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja:** Componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Lodrina, Embrapa Soja, 2007. 80p

HUNTER, W. J.; FAHRING, C. J. Movement by Rhizobium and nodulation of legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, n. 6, p. 537-542, 1980.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Resultados definitivos do censo agro 2017a.** Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76517. Acesso em: 27 de out. de 2022.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Resultados definitivos do censo agro 2017b.** Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76463. Acesso em: 01 de nov. de 2022.

ISLAM, M. S.; KAWASAKI, H.; MURAMATSU, Y.; NAKAGAWA, Y.; SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume Entada koshunensis from Iriomote Island in Japan. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 6, p. 1416-1429, 2008.

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, 1982.

KIIHL, R. A de S.; GARCIA, A. The use of the long-juvenile trait in breeding soybean cultivars. In: **World Soybean Research Conference**. 1989. p. 994-1000.

KLEPA, M. S.; HELENE, L. C. F.; O' HARA, G.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 005446, 2022.

KLUTHCOUSKI, J.; AIDAR, H. Implantação, condução e resultados obtidos com o Sistema Santa Fé. **Integração lavoura-pecuária. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, p. 407-442, 2003.

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. Rumo a uma avaliação mais robusta da diversidade intraespécie, usando menos marcadores genéticos. **Microbiologia aplicada e ambiental** , v. 72, n. 11, p. 7286-7293, 2006.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B; SOARES, A.L.L. Yield

and nodulation of cowpea inoculated with selected strains. **Revista Ceres**, v. 51, p. 67-82, 2004.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001.

LARANJO, M; YOUNG, J; PETER, W.; OLIVEIRA, S Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 359-367, 2012.

LEMOS, M. J. **Resposta de cultivares de trigo à inoculação em sementes com Azospirillum brasilense e à adubação nitrogenada em cobertura.** 2011. 62 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

LI, Y. H.; WANG, R.; ZHANG, X. X.; YOUNG, J. P. W.; WANG, E. T.; SUI, X. H.;CHEN, W. X. *Bradyrhizobium guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium guangxiense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. Pt_12, p. 4655-4661, 2015.

LI, Y. H.; WANG, R.; SUI, X. H.; WANG, E. T.; ZHANG, X. X.;, TIAN, C. F.; CHEN, W. X *Bradyrhizobium nanningense* sp. nov., *Bradyrhizobium guangzhouense* sp. nov. and *Bradyrhizobium zhanjiangense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut in Southeast China. **Systematic and applied microbiology**, v. 42, n. 5, p. 126002, 2019.

LIMA, C. J. G. S.; OLIVEIRA, F. D. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; ALMEIDA JUNIOR, A. B. Resposta do feijão caupi a salininidade da água de irrigação**.** **Rev Verde Agroec Desenv Sustent**, Mossoró, v. 2, n. 2, p. 79-86, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 1v. 384 p.

LOUREIRO, M. D. F.; KASCHUCK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, n. 6, p. 665-674, 2007.

LUPWAYI, N. Z.; CLAYTON, G. W.; RICE, W. A. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, New York, v. 15, p. 289-321, 2005.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic** Evolutionary Microbiology v. 57, p. 489-503, 2007.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former Sinorhizobium). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 1, p. 200-214, 2008.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 333-339, 2003.

MARTINS DA COSTA, E.; AZARIAS GUIMARÃES, A.; PEREIRA VICENTIN, R.; DE ALMEIDA RIBEIRO, P. R.; RIBAS LEÃO, A. C.; BALSANELLI, E.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 1211-1221, 2017.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T.; COSTA, A. A.; ROSA, F. V.; COSTA, V. D. **Efeito residual de leguminosas sobre o rendimento físico e econômico da cana-planta**. Campinas: Instituto Agronômico, v. 32, p. 15, 2001.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 12, p. 2934-2950, 2009.

MENNA, P. & HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 12, p. 3052-3067, 2011.

MERCANTE, F. M. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja? Como se beneficiar. **Encontro de plantio direto no cerrado**, v. 7, p. 25-29, 2003.

MERRILL, E. D. The Phytogeography of Cultivated Plants in Relation to Assumed Precolumbian Eurasian-American Contacts. **American Anthropologist**, v. 33, n. 3, p. 375-382, 1931.

MEYER, M. C.; DE FREITAS BUENO, A.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. Bioinsumos na cultura da soja. Brasília, DF: Embrapa, 2022. 550 p.

MICHEL, D. C.; PASSOS, S. R.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BARAÚNA, A. C.; DA SILVA, K.; PARMA, M. M.; ZILLI, J. E. *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from Centrolobium paraense grown in soil of Amazonia, Brazil. **Archives of microbiology**, v. 199, p. 657-664, 2017.

MICHEL, D. C.; GUIMARÃES, A. A.; DA Costa, E. M.; DE CARVALHO, T. S.; , BALSANELLI, E.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. S. *Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1135-1141, 2020.

MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. FEMS **Microbiology Ecology**, v. 26, p. 193-205, 1998.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n° 13, de 24 de março de 2011. Aprovar as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no brasil. Diário Oficial, 2011. Disponível em: < https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf> Acesso em: 13 de jan de 2023.

NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, N. G. Diversity and adaptability of Soybean cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 889-895,1997.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, p. 872-879, 2003.

OLIVEIRA, G.A.; ARAÚJO, W.F.; CRUZ, P.L.S.; SILVA, W.L.M.; FERREIRA, G.B. Resposta do feijão-caupi as lâminas de irrigação e as doses de fósforo no cerrado de Roraima. **Revista de Ciência Agronômica**, v. 42, p. 872-882, 2011.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; Lloret, L.; LÓPEZ,A; MARTINEZ, J.; VINUESA, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. **Rhizobial diversity in different land use systems in the rain forest of Los Tuxtlas,México.** In Below-Ground Biodiversity in Sierra de Santa Marta, Los Tuxtlas,Veracruz, Mexico. Edited by I. Barois, E. J. Huising, P. Okoth, D. Trejo & M. De los Santos. Xalapa, Mexico: Instituto de Ecología p. 65-84, 2009.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. **The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry. Berlin Heidelberg: Springer**, p. 427-51, 2013.

PALMER, M.; STEENKAMP, E. T.; BLOM, J.; HEDLUND, B. P.; VENTER, S. N. All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2937-2948, 2020.

PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; COUTINHO, H. L.; RUMJANEK, N. G. Use of the rpoB and 16S rDNA gene to analyse the bacterial diversity from native tropical soil by PCR/DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 35, p. 316-320, 2002.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 33, p. 219-226, 2009.

PEREIRA, R. G., ALBUQUERQUE, A. W. D., SOUZA, R. D. O., SILVA, A. D. D., SANTOS, J. P. A. D., BARROS, E. D. S., & MEDEIROS, P. V. Q. D. Sistemas de manejo do solo: soja [*Glycine max* (L.)] consorciada com *Brachiaria decumbens* (STAPF). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 1, p. 44-51, 2011.

PERES, J. R R.; MENDES, I. D. C.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, n. 3, p. 357-363, 1993.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.

PONTES, D. S.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; CHARTONE-SOUZA E.; NASCIMENTO, A. M. A. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** Berlin, v. 34, p. 463-473, 2007

PULDEKO, K.; MADRZAK, C. J. Influence of fungicide Funaben on nodulation of soybean in the field conditions. **Journal of Plant Protection Research, Oxford**, v. 44, n. 2, p. 155-159, 2004.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A.; RIVAS, R.; CAMACHO, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; MATEOS, P. F.; VELAZQUEZ, E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 1929-1934, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 7.ed.: Guanabara Koogan, 830 p. 2007.

REIS, V. M.; FERNARDES JÚNIOR, P. I. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p.

RIBEIRO, R. A.; MARTINS, T. B.; ORMENO-ORRILLO, E.; MARCON DELAMUTA, J. R.; ROGEL, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium ecuadorense* sp. nov., an indigenous N2-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. Pt_9, p. 3162-3169, 2015.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 101-110, 2009.

ROCHA, M.M.; FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; CARVALHO, H.W.L.; BELARMINO FILHO, J.; RAPOSO, J.A.A.; ALCÂNTARA, J.P.; RAMOS, S.R.R.; MACHADO, C.F. 2007. Adaptabilidade e estabilidade produtiva de genótipos de feijão-caupi de porte semi-ereto na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1283-1289.

RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, N. E. **Diversidad y eficiencia simbiótica de rizobios naturalizados que nodulan soja en Uruguay**. Tesis de maestría. Montevideo. Udelar. Fa, 2020.

ROVIRA, A. D. Rhizobium numbers in the rhizospheres of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. **Australian journal of agricultural research**, v. 12, n. 1, p. 77-83, 1961.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica do nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.) **Feijão-caupi:** avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa, 2005. p. 281-335.

SAITOU, N.; NEI, M. O método de união de vizinhos: um novo método para reconstruir árvores filogenéticas. **Biologia molecular e evolução**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, V.A.F.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Efficiency of soybean nodules related to rhizobia hydrogenase is influenced by light level. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, p.15-21, 1996.

SANTOS J. I. **Otimização da cadeia produtiva de grãos para o território do médio sertão de alagoas como forma de combate à desertificação.** 82 f, monografia (Curso de Desenvolvimento Sustentável do Semi Árido, Universidade Federal de Campina Grande – PB, 2008).

SARITA, S.; SHARMA, P. K.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2005.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Tecnologias de produção e usos da soja. **Londrina: Mecenas**, 314 p. 2009.

SILVA, M. B.; MORANDI, M.; JUNIOR, T.; VENZON, M.; FONSECA, M.; JUNIOR, T. Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. **Viçosa: EPAMIG**, 232 p. 2010.

SILVA, M. D. F. D.; SANTOS, C. E. D. R.; SOUSA, C. A. D.; ARAÚJO, R. D. S. L.; STAMFORD, N. P.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. Nodulação e eficiência da fixação do N2 em feijão-caupi por efeito da taxa do inóculo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1418-1425, 2012.

SILVA NETO, M. L. D.; SMIDERLE, O. J.; SILVA, K. D.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. É. Compatibilidade do tratamento de sementes de feijão-caupi com fungicidas e inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 80-87, 2013.

SINIMBU, F. Safra recorde de feijão caupi no Mato Grosso. 2009. Disponível em: http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2009. Acesso em: 01 de nov. 2022.

SOARES, A.L. de L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R.; VALE, H.M.M. do; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. de; MOREIRA, F.M. de S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): II - feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 803-811, 2006.
SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704p

SOUZA, L.S.B; MOURA, M.S.B.; SEDIYAMA, G.C.; SILVA, T.G.F. Eficiência douso da água das culturas do milho e do feijão-caupi sob sistemas de plantio exclusivo e consorciado no semiárido brasileiro. **Bragantia**, v. 70, p. 715-721, 2011.

STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

STACKEBRANDT, E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiol. Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.

STAMFORD, N.; SANTOS, D. R.; SILVA, V. M.; SANTOS, C. E. R. S.; MONTEIRO, M. C. Fixação do N2 e matéria seca do caupi em dois solos de semi-árido brasileiro submetido a deficiência hídrica. R. bras. **Ci. Solo**, v. 14, p. 283-290, 1990.

STEENKAMP, E. T.; STEPKOWSKI, T.; PRZYMUSIAK, A.; BOTHA, W. J.; LAW, I. J. Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 3, p. 1131-1144, 2008.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYZANSKA, A.; LAW, I. J.; HOWIESON, J. 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, 2005.

SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. Phylogenetic Inference. In Hillis, D.M.; MORTIZ, D.; MABLE, B.K.; editors, **Molecular Systematics**, p. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 678-687, 1992.

TEANEY III, G.B.; FUHRMANN, J.J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxine phenotype. **Plant and Soil**, v.145, p.275-285, 1992.

UNKOVICH, M. J.; PATE, J. S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N2 fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 211-228, 2000.

VAN BERKUM, P.; TEREFEFORK, Z.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; LINDSTROM, K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the rrn loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2988–2998, 2003

VANDAMME, P.; Pot, B., Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VIEIRA, C. **O feijoeiro-comum: cultura, doenças e melhoramento**. Viçosa: UFV, 1967. 220p.

VIEIRA, R. F. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**. Brasília, DF : Embrapa, 2017. 163 p

VINCENT, J.M. **A manual for the pratical study of root nodules bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 34, n. 1, p. 29-54, 2005.

WANG, E. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root-and stem-nodule bacteria associated with legumes. **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process.**, p. 177-186, 2000.

WANG, R.; CHANG, Y. L.; ZHENG, W. T.; ZHANG, D.; ZHANG, X. X.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. Bradyrhizobium arachidis sp. nov., isolated from effective nodules of Arachis hypogaea grown in China. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 2, p. 101-105, 2013.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Phylogenetic and DNA– DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. **International Journal of Systematic of Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.111–117, 2001.

WOLPERT, J. S.; ALBERSHEIM, P. Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the o-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont Rhizobia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 70, n. 3, p. 729-737, 1976.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F. D.; SANTOS, V. B. D.; CAMPOS, F. L.. Ontogenia da nodulação de duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 561-564, 2007.

YAO, Y.; SUI, X. H.; ZHANG, X. X.; WANG, E. T.; & CHEN, W. X. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. Pt_6, p. 1831-1837, 2015.

ZHANG, Y. M.; LI JR, Y.; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; LI, Q. Q.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1951-1957, 2012.

ZILLI, J. É. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para a inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas de Cerrado.** 112p. Dissertação Mestrado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2001

ZILLI, J. É.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

ZILLI, J. É.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. **BR 3262:** nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2008. 7p. (Embrapa Roraima. Comunicado técnico, 10).

ZILLI, J. É.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**, Boa Vista: Embrapa Roraima, p. 356, 2009.

ZILLI, J. É.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 335-337, 2010a.

ZILLI, J. É.; SMIDERLE, O. J.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. The effectiveness of different formulations of inoculants containing *Bradyrhizobium* on the soybean crop in Roraima. **Agro@ mbiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 56-61, 2010b.

ZILLI, J. É.; SILVA NETO, M. L. D.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R. D. Cowpea response to inoculation with *Bradyrhizobium* strains recommended for soybean. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 739-742, 2011.

ZILLI, J. É.; GUARESCHI, R. Desempenho de genótipos de soja nas condições edafoclimáticas da região Norte e Noroeste do estado do Rio de Janeiro. **Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner**, 2020.

ZOTARELLI, L. **Balanço de nitrogênio na rotação de culturas em sistema de plantio direto e convencional na região de Londrina-PR**. 2000. 128 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A

Tabela 1A – Estirpes isoladas dos campos experimentais da Embrapa Agrobiologia utilizadas no estudo (continua)

Código	Espécie	Bioma	Coordenadas	Município	Cultivar de origem
BR 10733 (B2-16-CA4)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR10734 (P2-29)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10735 (P2-11)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10736 (P2-27)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10737 (P2-16)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10738 (B2-17-CA4)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10739 (B7-15)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10740 (B2-6-CA4)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10741 (P2-1)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10742 (P7-6B)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10744 (B7-10)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10745 (B7-16)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10746 (B7-19)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10748 (E2-3)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10749 (E2-4)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10750 (P7-28)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10756 (P7-12)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10757 (P7-19)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*

Tabela 1A. Continuação

BR 10758 (P7-32)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10759 (P2-23)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10760 (P7-11)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10778 (P7-22)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10779 (P7-36)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10780 (P7-40)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10925 (P7-6A)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10926 (P7-7A)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10941 (P2-31)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 10983 (P7-9)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 12537 (E7-5)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 12538 (P7-27)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Vigna unguiculata*
BR 13891 (1.1)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13892 (1.2)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13893 (1.3)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13894 (1.4)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13895 (1.5)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13916 (2.3)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13917 (2.4)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13918 (2.5)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13956 (9.2)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*

Tabela 1A. Continuação.

BR 13970 (12.1)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13971 (12.2)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13973 (12.4)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13974 (12.5)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13984 (20.2)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13985 (20.3)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13986 (20.4)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13996 (24.2)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13997 (24.3)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 13998 (24.4)	*Bradyrhizobium sp.*	Mata Atlântica	22° 45' 13.00" S 43° 40' 23.00" W	Seropédica/RJ	*Glycine max*
BR 14157 (20.5)	*Bradyrhizobium sp*	Mata Atlântica	22° 45’ 13.00” S 43° 40’ 23.00” W	Seropédica/RJ	*Glycine max*

Fonte: Autora (2022).

7.2 Anexo B

Tabela 8B – Caracterização morfocultural das estirpes (continua)

Estirpe	Tempo de crescimento	pH	Produção de muco	Massa de crescimento	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia	Transparência	Cromogênese
BR 10733	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10734	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10735	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10736	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10737	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
BR 10738	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10739	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10740	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10741	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10742	Lenta	Alcalino	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 10744	Lenta	Alcalino	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarelo
BR 10745	Lenta	Alcalino	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Amarelo
BR 10746	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10748	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10749	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10750	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10756	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
BR 10757	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10758	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10759	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco

Tabela 8B. Continuação.

BR 10760	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
BR 10778	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10779	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10780	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 10925	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
BR 10926	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
BR 10941	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
BR 10983	Intermediária	Alcalino	Moderada	Consistente	Irregular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 12537	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 12538	Intermediária	Alcalino	Abundante	Aquosa	Irregular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 13891	Lenta	Neutro	Moderada	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 13892	Lenta	Neutro	Moderada	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13893	Lenta	Neutro	Moderada	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13894	Lenta	Neutro	Moderada	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13895	Lenta	Neutro	Moderada	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13916	Lenta	Neutro	Moderada	Aquosa	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13917	Lenta	Neutro	Moderada	Consistente	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13918	Lenta	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13956	Lenta	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Creme
BR 13970	Intermediária	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
BR 13971	Intermediária	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
BR 13973	Intermediária	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
BR 13974	Intermediária	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme

Tabela 8B. Continuação.

BR 13984	Intermediária	Neutro	Moderada	Aquosa	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
BR 13985	Intermediária	Neutro	Moderada	Aquosa	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
BR 13986	Intermediária	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Creme
BR 13996	Intermediária	Neutro	Moderada	Aquosa	Irregular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 13997	Intermediária	Neutro	Moderada	Aquosa	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
BR 13998	Lenta	Neutro	Pouca	Consistente	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
BR 14157	Intermediária	Neutro	Abundante	Aquosa	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco

Fonte: Autora (2022).

7.3 Anexo C

Tabela 9C – Lista do código de acesso do NCBI das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* (continua)

Estirpes	16S	recA	gyrB	nodC
B. arachidis CCBAU 051107	HM107167	HM107233.1	JX437675.1	HM107267.1
B. huanghuaihaiense CCBAU 23303	HQ231463	HQ231595.1	KF962695.1	HQ231507.1
B. iriomotense NBRC 102520	AB681854	-	-	-
B. ingae BR 10250	KF927043	KF927061.1	KF927079.1	KF927054.1
B. sacchari p9-20	KF113091	KX065095.1	-	KF196792.2
B. stylosanthis BR 446	KU724142	KU724163.1	KU724151.1	KU724160.1
B. diazoefficiens USDA 110 D13430	D13430	-	-	-
B. niftali CNPSo 3448	MK673807	MK675797.1	MK675794.1	MK675806.1
B. japonicum DSMZ 30131	X87272	AM182158.1	AM418801.1	D28962.1
B. betae NBRC 103048	AB681928	-	-	-
B. nitroreducens TSA1	AB542368	-	-	-
B. frederickii CNPSo 3426	MK672937	MK682710.1	MK682721.1	MK682743.1
B. guangxiense CCBAU 53363	KC508877	KC509279.1	KC509082.1	KX683397.1
B. nanningense CCBAU 53390	KC508872	KC509274.1	KC509077.1	KC509233.1
B. centrosematis A9	KC247115	KC247145.1	-	KC247134.1
B. cosmicum 58S1	KP768789	KF615104.1	KP768731.1	-
B. vignae 7-2	KP899563	KM378374.1	-	KT362339.1
B. hipponense aSej3	MK458611	-	-	-
B. rifense CTAW71	EU561074	GU001585.1	KF532654.1	EU597853.2
B. cytisi strain CTAW11	EU561065	GU001575.1	KF532653.1	EU597844.2
B. ganzhouense RITF806	JQ796661	JX277144.1	-	JX292035.1
B. campsiandrae INPA 394B	KU230298	KT793146.1	KT793134.1	-
B. guangdongense CGMCC 1.15034	MT760081	-	-	-
B. guangzhouense CCBAU 51670	KC508852	KC509254.1	KC509057.1	KX683403.1
B. manausense BR 3351	HQ641226	KF785992.1	KF786000.1	KF786002.1
B. oligotrophicum JCM 1494	D78366	-	-	-

Tabela 9C. Continuação.				
B. denitrificans IFAM 1005	AF338176	-	-	-
B. zhanjiangense CCBAU 51778	KC508861	KC509263.1	KC509066.1	KC509225.1
B. kavangense 14-3	KP899562	KM378399.1	KX661397.1	KT033402.1
B. cajani AMBPC1010	KY349447	KY349440.1	-	KY349444.1
B. liaoningense 2281	AF208513	-	-	-
B. diversitatis CNPSo 4019	MK676046	MK863430.1	MK860850.1	MK893234.1
B. daqingense CCBAU 15774	KJ184551	HQ231270.1	KF962694.1	HQ231326.1
B. americanum CMVU44	KU991833	KC247143.1	-	KC247130.1
B. shewense ERR11	FMAI01000010	-	-	
B. ottawaense OO99	JN186270	HQ587287.1	HQ873179.1	HQ587980.1
B. canariense BTA-1	AJ558025	AY591553.1	-	-
B. symbiodeficiens 85S1MB	KP768783	KF615036.1	KP768725.1	-
B. amphicarpaeae 39S1MB	KP768779	KF615002.1	KP768721.1	-
B. lupini DSM 30140	X87273	MN525209.1	-	-
B. subterraneum 58 2-1	KP308152	KM378397.1	KX661396.1	MH182918.1
B. forestalis INPA54B	KR779520	KF452867.1	KF452831.1	KT793177.1
B. yuanmingense CCBAU 10071	AF193818	AY591566.1	-	-
B. glycinis CNPSo 4016	MK676047	MK863431.1	MK860851.1	MK893235.1
B. agreste CNPSo 4010	MK676048	MK863432.1	MK860852.1	MK893236.1
B. neotropicale BR 10247	KF927051	KJ661714.1	KJ661707.1	KJ661727.1
B. centrolobii BR 10245	KF927049	KX527954.1	KX528004.1	KX527941.1
B. retamae Ro19	KC247085	KC247094.1	KF896204.1	KC247112.1
B. archetypum CNPSo 4013	MK676065	MK863448.1	MK860868.1	MK893251.1
B. murdochi CNPSo 4020	MK676062	MK863445.1	MK860865.1	MK893248.1
B. valentinum LmjM3	JX514883	JX518589.2	-	-
B. australiense CNPSo 4014	MK676067	-	-	-
B. algeriense RST89	FJ546419	FJ264927.1	-	-
B. lablabi CCBAU 23086	GU433448	GU433522.1	JX437670.1	GU433565.1
B. acaciae 10BB	LR877293	-	-	-
B. uaiense UFLA03-164	NZ KHP01000252	-	-	-
B. oropedii Pear76	LR877297	KM378377.1	LN650208.1	-

Tabela 9C. Continuação.				
B. namibiense 5-10	KX661401	KM378377.1	KX661393.1	KX661399.1
B. icense LMTR 13	KF896156	JX943615.1	KF896201.1	KF896159.1
B. paxllaeri LMTR 21	AY923031	JX943617.1	KF896195.1	KF896160.1
B. septentrionale 1S1	KP768787	KF615049.1	KP768729.1	KF615620.1
B. quebecense 66S1MB	KP768782	KF615025.1	KP768724.1	KF615618.1
B. altum Pear77	LR877298	LN650167.1	LN650209.1	-
B. mercantei SEMIA 6399	FJ025102	KX690615.1	KX690623.1	-
B. erythrophlei CCBAU 53325	KF114645	KF114669.1	KF114717.1	KF114576.1
B. embrapense SEMIA 6208	AY904773	HQ634899.1	HQ634891.1	KP234521.1
B. viridifuturi SEMIA 690	FJ025107	KR149140.1	KR149134.1	-
B. jicamae PAC 68	AY624134	HM047133.1	HQ873309.1	HM047129.1
B. ferriligni CCBAU 51502	KX683400	KJ818112.1	KJ818102.1	KJ818109.1
B. ivorense CI-1B	KX396570	MK376330.1	MH756161.1	-
B. macuxiense BR 10303	LNCU01000022	KX527958.1	KX528008.1	BR_10303
B. ripae WR4	MF593081	MF593090.1	MF593094.1	MF593106.1
B. brasilense UFLA03 321	KF311068	AY591568.1	-	-
B. elkanii NBRC 14791	AB509378	-	-	-
B. elkanii USDA 76	-	AY591568.1	AM418800.1	D28964.1
B. pachyrhizi PAC48	AY624135	-	-	-
B. pachyrizi BR 3262	-	-	KT005409.1	KF828819.1
B. pachyrhizi LMG 24246	-	HM047130.1	HQ873310.1	HM047128.1
B. tropiciagri SEMIA 6148	AY904753	FJ391168.1	HQ634890.1	KP234520.1

Fonte: Autora (2023).