



DANIELE CABRAL MICHEL

**TAXONOMY AND GENOMICS OF *BRADYRHIZOBIUM*
STRAINS ISOLATED FROM TROPICAL LEGUMES**

**LAVRAS – MG
2022**

DANIELE CABRAL MICHEL

**TAXONOMY AND GENOMICS OF *BRADYRHIZOBIUM* STRAINS ISOLATED
FROM TROPICAL LEGUMES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração Biologia, Microbiologia e Processos biológicos do solo, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

Prof. Dr. Teotonio Soares de Carvalho
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Michel, Daniele Cabral.

Taxonomy and Genomic of *Bradyrhizobium* strains isolated
from tropical legumes / Daniele Cabral Michel. - 2022.

211 p. : il.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Coorientador(a): Teotonio Soares de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Descrição de espécies. 2. Anotação Genômica. 3. Genômica
comparativa. I. Moreira, Fatima Maria de Souza. II. de Carvalho,
Teotonio Soares. III. Título.

DANIELE CABRAL MICHEL

**TAXONOMIA E GENÔMICA DE ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* ISOLADAS
DE LEGUMINOSAS TROPICAIS**

**TAXONOMY AND GENOMICS OF *BRADYRHIZOBIUM* STRAINS ISOLATED
FROM TROPICAL LEGUMES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 25 de agosto de 2022

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira	UFLA
Dr. Teotonio Soares de Carvalho	UFLA
Dr. Jerri Edson Zilli	EMBRAPA/ Agrobiologia
Dra. Elaine Martins da Costa	UFPI
Dra. Irene da Silva Coelho	UFRRJ

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

Prof. Dr. Teotonio Soares de Carvalho
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

*Aos meus pais, ao meu irmão, a minha família e amigos
e àqueles que me apoiaram nessa jornada.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Afonso e Selma e ao meu irmão Fábio por todo amor, carinho, compreensão e por sempre me apoiarem todas as decisões que tomei nessa jornada.

A toda minha família, paterna e materna e, especialmente em memória aos meus tios Jorginho, Carlos e a minha vozinha Elisa que partiram para o plano espiritual durante essa trajetória.

Ao William por todo carinho e paciência.

Ao meu afilhado João e sua família linda que pacientemente entenderam a minha ausência.

Aos amigos Franciele, Jordana, Helen, Rafael e Bino pelos momentos marcantes, pelas conversas, pelo apoio, vocês foram minha família durante o doutorado.

Aos amigos de Lavras, muito obrigada por terem me acolhido.

A professora Fatima pela orientação, pelos ensinamentos e atenção durante o Doutorado.

Ao professor Teotônio por todos os ensinamentos, pela paciência e disponibilidade para ensinar.

A Amanda que para mim foi como coorientadora, pois me ajudou em muitos momentos a traçar metas, desenvolver trabalhos laboratoriais e escrever artigos científicos.

A Universidade Federal de Lavras pelo ensino de excelência e por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização da Tese.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência do Solo e aos professores do programa pela minha formação profissional.

Às Instituições de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e Fapemig pela concessão da bolsa e financiamento de análises e equipamentos utilizados. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Só temos certezas enquanto sabemos pouco; com o conhecimento
as dúvidas aumentam.”*

(Johann Wolfgang von Goethe)

RESUMO

As leguminosas tropicais apresentam ampla distribuição geográfica e são extremamente importantes para o equilíbrio natural dos ambientes que habitam. Esse grupo de espécies vegetais é altamente diverso taxonomicamente e está presente em diferentes condições edafoclimáticas. Essa família têm a capacidade de estabelecer simbiose com diferentes gêneros de bactérias fixadoras de N₂. Dentre eles, se destaca *Bradyrhizobium*, por formar simbiose com várias espécies de importância econômica e/ou ambiental, incluindo a soja. O primeiro objetivo desse trabalho foi identificar em nível de espécie estirpes do gênero *Bradyrhizobium* e o segundo foi verificar a relação entre genes simbióticos e a eficiência, origem geográfica e as espécies vegetais hospedeiras, em 38 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de 3 espécies de leguminosas (amendoim forrageiro, soja e feijão-fava). Além disso, foram descritas 3 novas espécies de *Bradyrhizobium*, sendo uma de soja e oriunda do grupo de 38 estirpes e outras duas de feijão-caupi e *Campsiandra Laurilifolia* Benth., respectivamente. Os 38 genomas das estirpes isoladas foram sequenciados e tiveram os genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*, *nodN*, *nodZ*, *nodW*, *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK*, *nifN*, *nifQ*, *nifX*, *nifZ*, *fixJ*, *fixL* analisados filogeneticamente. As árvores dos genes estudados mostraram que as estirpes se posicionaram em função de suas plantas hospedeiras. Para a descrição das três novas espécies foram realizadas análises genômicas, filogenéticas e fenotípicas (temperatura, pH, salinidade, assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e resistência a antibióticos). Com base no ANI (average nucleotide identity) $\geq 96\%$ dos genomas das estirpes simbiotes de cada uma das três espécies de leguminosas estudadas foram identificadas as seguintes espécies de *Bradyrhizobium*: *B. japonicum* e *B. elkanii*, *B. guangdongense* e *B. brasilense* em soja, e *B. zhanjiagense*, *B. forestalis* e *B. pachyrhizi* em fava. Todas as estirpes de amendoim forrageiro representaram novas espécies. Além destas, também foram encontradas outras possíveis novas espécies: uma do feijão-fava e uma de soja, esta última já descrita nesse trabalho (*B. uflense*). A concatenação de genes “housekeeping” (*recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *glnII* e *rpoB*) das 3 possíveis novas espécies mostrou que estas se posicionaram em clusters diferentes dos que continham as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas. O ANI confirmou as três novas espécies e elas receberam os nomes *Bradyrhizobium uflense*, *Bradyrhizobium uaiense* e *Bradyrhizobium campsiandrae*, cujas estirpes tipo são UFLA06-05^T, UFLA03-164^T e UFLA 01-1174^T, respectivamente. Os genes *nod*, *nif* e *fix* mostraram que o posicionamento filogenético das estirpes não teve relação com a origem geográfica. Não foi possível estabelecer relação entre os genes *nif* e a eficiência em fixar N simbioticamente. As estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas apresentaram significativa diferença filogenética, evidenciando a elevada diversidade entre estirpes das espécies desse gênero que são nativas de solos brasileiros e estabelecem simbiose com diferentes espécies de leguminosas nativas ou exóticas.

Palavras-chave: ANI. Filogenia. Fixação Biológica de Nitrogênio

ABSTRACT

Tropical legumes have a wide geographic distribution and are extremely important for the natural balance of the environments where they are found. This group of plant species has increased taxonomic diversity and it is found under different edaphoclimatic conditions. This Family has the ability to establish symbiosis with different genus of N₂-fixing bacteria. Among them, *Bradyrhizobium* stands out, for forming symbiosis with several species of economic and, or environmental importance including soybean. The first objective of this work was to identify at the species level strains from *Bradyrhizobium* genus and the second was to verify the relationship between symbiotic genes and efficiency, geographic origin, and the host plant species, in 38 *Bradyrhizobium* strains isolated from 3 legume species (forage peanut, soybean and lima-bean). In addition, 3 new species of *Bradyrhizobium*, one from soybean from the group of 38 strains and two from cowpea bean and *Campsiandra Laurilifolia* Benth., respectively, were described. The 38 genomes of the strains isolated from Lima bean, forage peanut, and soybean were sequenced, and the genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*, *nodN*, *nodZ*, *nodW*, *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK*, *nifN*, *nifQ*, *nifX*, *nifZ*, *fixJ*, *fixL* were phylogenetically analyzed. The phylogenetic trees of the studied genes showed that the strains were positioned according to their host plants. To describe the three new species, genomic, phylogenetic, and phenotypic analyzes were performed (temperature, pH, salinity, assimilation of different carbon and nitrogen sources and antibiotic resistance). Based on the ANI (average nucleotide identity) $\geq 96\%$ of the genomes of the symbiotic strains of each studied legume species, the following species of *Bradyrhizobium* were identified: *B. japonicum* e *B. elkanii* e *B. guangdongense* and *B. brasilense*, in soybean, e *B. zhanjiagense*, *B. forestalis* e *B. pachyrhizi*. in Lima bean. All forage peanut strains represented a new species. In addition to these, other possible new species were also found: one from the fava and one from soybean, the latter already described in this work (*B. uflense*). The concatenation of housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *glnII* e *rpoB*) of the 3 possible new species showed that they were positioned in different clusters from those containing the type strains from *Bradyrhizobium* species already described. The ANI confirmed the three new species, and they were named as *Bradyrhizobium uflense*, *Bradyrhizobium uaiense* e *Bradyrhizobium campsiandrae*, whose type strains are UFLA06-05^T, UFLA03-164^T e UFLA 01-1174^T, respectively. The *nod*, *nif* and *fix* genes showed that the phylogenetic position of the strains was not related to their geographic origin. It was not possible to establish a relationship between the *nif* genes and the efficiency in fixing N symbiotically. The studied *Bradyrhizobium* strains showed significant phylogenetic differences, evidencing the high diversity between strains within the species of this genus which are native to Brazilian soils and establish symbiosis with different species of native or exotic legumes.

Keywords: ANI. Phylogeny. Biological Nitrogen Fixation

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Fixação biológica de nitrogênio simbiótica em leguminosas	12
2.2 Gênero <i>Bradyrhizobium</i>	13
2.3 Histórico taxonômico dos procariotos	14
2.4 Prospecção de genes	17
2.5 Genes simbióticos e suas funções	19
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	36
ARTIGO 1- <i>Bradyrhizobium uaiense</i> sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont	36
ARTIGO 2 - <i>Bradyrhizobium campsiandrae</i> sp. nov., a nitrogen-fixing bacterial strain isolated from a native leguminous tree from the Amazon adapted to flooded conditions	64
ARTIGO 3 - Genômica comparativa e estudo evolutivo de genes <i>nod</i> anotados em 38 estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> simbiotes de <i>Arachis pintoi</i>, <i>Glycine max</i> e <i>Phaseolus lunatus</i> L.	88
ARTIGO 04 - <i>Bradyrhizobium uflense</i> sp. nov. a new symbiotic species isolated from soybean in Minas Gerais, Brazil	143
ARTIGO 05 – Filogenia de genes relacionadas a fixação biológica de nitrogênio em 38 estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. simbiotes de <i>Glycine max</i> L., <i>Arachis pintoi</i> e <i>Phaseolus lunatus</i> L. .	171

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo reconhecidamente importante para a natureza. Através dela, o N₂ atmosférico é convertido em uma forma assimilável para as plantas pela ação de microrganismos possuidores da enzima nitrogenase. A FBN pode contribuir para a diminuição da utilização de insumos nitrogenados na agricultura, permitindo uma produção mais sustentável econômica e ambientalmente. A fixação biológica de nitrogênio pode ocorrer de diferentes formas. As mais eficientes em relação à contribuição para o crescimento vegetal são as simbióticas, destacando-se as simbioses entre leguminosas e bactérias nodulíferas denominadas de rizóbios, que compreendem diferentes espécies de Alfa-proteobactérias e Beta-proteobactérias (REMIGI et al., 2016). O grupo dos rizóbios é formado por microrganismos de 18 diferentes gêneros, dentre eles está o *Bradyrhizobium* (de LAJUDIE et al., 2019).

O gênero *Bradyrhizobium* compreende estirpes de grande importância agrícola que contribuem significativamente para a nutrição nitrogenada. Um exemplo disso é a utilização de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* que supre todo o nitrogênio necessário para a cultura da soja. Dentre as estirpes hoje utilizadas como inoculante na cultura da soja estão *B. elkanii* SEMIA 587, *B. japonicum* SEMIA 5079, *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e *B. elkanii* SEMIA 5019 (COSTA et al., 2020). O gênero *Bradyrhizobium* atualmente possui 82 espécies descritas ([LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature \(bacterio.net\)](https://www.bacterio.net/)). Dentre elas estão isolados de diferentes regiões brasileiras como *B. manausense*, *B. neotropicale*, *B. embrapense*, *B. tropiciagri*, *B. stylosanthis*, *B. mercantei*, *B. centrolobii*, *B. macuxiense*, *B. forestalis*, *B. uaiense*, *B. campsiandrae*, (SILVA et al., 2014; ZILLI et al., 2014; DELAMUTA et al., 2015; DELAMUTA et al., 2016; MICHEL et al., 2017; HELENE et al., 2017; COSTA et al., 2017; COSTA et al., 2018; MICHEL et al., 2020; MICHEL et al., 2021).

Para a descrição de espécies bacterianas, o sequenciamento de marcadores moleculares como o gene 16S rRNA e genes “housekeeping” (genes essenciais para a manutenção da célula microbiana) têm sido utilizados. Além desses genes, para uma descrição mais precisa de espécies de bactérias do grupo dos rizóbios tem sido recomendado a utilização de informações genômicas e uma comparação apropriada entre o genoma da nova espécie e os genomas das

estirpes tipo das espécies mais proximamente relacionadas (de LAJUDIE et al., 2019). Atualmente, uma técnica bastante utilizada para comparação entre os genomas é o ANI (*average nucleotide identity*) (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005). A necessidade de realizar o sequenciamento de genomas e posterior comparação genômica, através da técnica do ANI, se deu devido à baixa resolução de diferenciação taxonômica, a nível de espécie do gene 16S rRNA (WILLEMS et al., 2001) e como ocorre em alguns casos, nem mesmo os genes “housekeeping” são capazes de discriminar de forma eficiente espécies distintas. Com isso, tem sido recomendada a utilização do ANI para discriminar taxonomicamente uma espécie de procarionto de estirpes tipo de todas as espécies já descritas. Valores abaixo de $\geq 95-96\%$ indicam que a estirpe em estudo é uma nova espécie (RICHTER; ROSSSELLÓ-MORA, 2009; de LAJUDIE et al., 2019).

Nos últimos 15 anos, houve uma evolução de ferramentas que se baseiam não só em genes específicos, mas também o genoma como um todo (KONSTANTINIDIS; TIEDJE 2005; COSTA et al., 2018; BROMFIELD et al., 2019; BROMFIELD et al., 2021). A utilização da genômica não se restringe apenas a taxonomia e a filogenia na classificação de espécies, mas também pode ser aplicada na genômica funcional, ou seja, no estudo dos genes associados as funções específicas das células microbianas em determinados ambientes como, por exemplo, solubilização de fosfato, produção de auxina, sequestro de carbono e fixação biológica de nitrogênio. Diversos estudos têm mostrado quais genes estão envolvidos na fixação biológica de nitrogênio no grupo dos rizóbios (BROUGHTON et al. 2000; WANG et al. 2012; MASSON-BOIVIN; SACKS, 2018). Pode-se citar os responsáveis pela síntese e exportação de fatores Nod (*nod*, *nol* e *noe*) e aqueles responsáveis pela síntese, processamento e montagem do complexo da nitrogenase (*nif*, *fix* e *fdx*) (REMIGI et al. 2016). As funções desses genes têm sido identificadas ao longo das últimas décadas (PERRET et al., 2000, MASSON-BOIVIN et al., 2009; SHAMSELDIN, 2013), o que tem contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos no processo de FBN.

Logo, o objetivo desse trabalho foi identificar em nível de espécie estirpes de *Bradyrhizobium* simbiotes de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava. Assim como verificar a relação entre genes simbióticos e a eficiência em fixar biologicamente o N₂, a origem geográfica e as espécies vegetais hospedeiras, em 38 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de 3 espécies de leguminosas selecionadas para esse estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fixação biológica de nitrogênio simbiótica em leguminosas

A fixação biológica de nitrogênio é um processo essencial na natureza. Ele consiste na transformação do N_2 presente na atmosfera, não disponível a plantas, para a forma assimilável NH_3 (amônia). Essa conversão do N (nitrogênio) ocorre devido a habilidade de um grupo restrito de procariotos que possuem o complexo enzimático nitrogenase que é capaz de quebrar a tripla ligação do gás N_2 à forma inorgânica NH_3 . Dentro desse grupo de organismos tem-se os que formam simbiose com leguminosas que são denominados de rizóbios ou bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. Eles formam estruturas especializadas, nas raízes ou excepcionalmente no caule, denominadas nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A associação simbiótica entre leguminosas e mais precisamente bactérias nodulíferas pertencentes ao grupo dos rizóbios tem persistido na natureza e sido remodelada ao longo de milhões de anos. Tem sido amplamente estudada ao longo do tempo. Isso se dá não só pelo modelo mutualístico especializado que apresenta como também por ser um componente fundamental na agricultura sustentável (TIAN et al., 2012). Alguns estudos com a inoculação desses microrganismos têm mostrado resultados bastante satisfatórios na produção de algumas culturas. O gênero *Bradyrhizobium*, em particular, tem mostrado resultados bastante satisfatórios como na soja (ALVES et al., 2003; ZILLI et al., 2021), feijão-caupi (SOARES et al., 2006; FARIAS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020), amendoim forrageiro (MIRANDA et al., 2003).

2.2 Gênero *Bradyrhizobium*

As bactérias capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em plantas pertencentes ao grupo das leguminosas foram, a princípio, classificadas como *Bacillus radicola* e, seguidamente acomodadas dentro do gênero *Rhizobium* (FRANK, 1889). No entanto, com a crescente caracterização desse gênero, observou-se que alguns organismos apresentavam algumas características diferenciadas, dentre elas, o crescimento lento em meio 79. Dessa forma, posteriormente, o grupo de bactérias que cresciam mais lentamente foi denominado de *Bradyrhizobium*. Atualmente há 18 gêneros de rizóbios conhecidos, pertencendo a família Rhizobiaceae. Dentre eles estão os pertencentes a classe Alfaproteobactérias: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*, *Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium* e *Devosia*. E os pertencentes a classe Betaproteobactérias *Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *Trinickia* (de LAJUDIE et al., 2019)

O gênero *Bradyrhizobium*, pertencente à classe Alfaproteobacteria, é bastante versátil pois é capaz de estabelecer simbiose com várias espécies de leguminosas tropicais em condições diversas e contrastantes (MOREIRA et al., 1993). Tem a habilidade de sobreviver endofiticamente (ISLAM et al., 2008) e é encontrado saprofiticamente em diversas condições de solo sendo frequentemente detectado por métodos independentes de cultivo (FONSECA et al. 2018; STONE et al. 2021). Sua alta diversidade é demonstrada pelas 82 espécies atualmente existentes (LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net) que certamente irão aumentar à medida que isolados de espécies pouco estudadas e/ou comunidades de rizóbio de várias regiões sejam isolados e pesquisados.

Diversos estudos têm mostrado que espécies desse gênero de bactérias são bastante eficientes na FBN e estabelecem associações com leguminosas muito bem-sucedidas. Um importante exemplo do sucesso dessa relação simbiótica de *Bradyrhizobium* é com a soja. A FBN dispensa a aplicação de fertilizante nitrogenado, gerando uma economia de bilhões de dólares com a substituição de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA; MENDES 2015; ZILLI et al., 2020). Por isso, nas últimas décadas, cientistas buscam cada vez mais entender e identificar espécies dentro deste gênero de bactérias e a capacidade delas em promover o crescimento em leguminosas, analisando seus genomas e identificando os genes envolvidos na FBN e em outros processos promotores de crescimento vegetal.

2.3 Histórico taxonômico dos procariotos

Muitos estudos taxonômicos têm sido realizados com microrganismos pertencentes ao grupo dos rizóbios. Estes microrganismos são de grande importância por realizarem um processo essencial à vida, a disponibilização do N às plantas, elemento esse essencial para a manutenção das células vegetais. Além disso, promovem a manutenção e restauração da fertilidade dos solos (BERRADA e BENBRAHIM, 2014). Através desses estudos tem se obtido um maior entendimento da diversidade desses organismos e a relação entre eles (GEVERS et al., 2005), trazendo à comunidade científica maior entendimento da evolução desses organismos.

Durante os séculos XVII e XVIII, a classificação de microrganismos era baseada apenas em características morfológicas (ROSSELO-MORA et al., 2001). Já no final do século XIX, critérios como o substrato necessário ao crescimento de bactérias e o potencial patogênico passaram a ser considerados (LEHMANN; NEUMANN, 1896). Nessa mesma época organismos capazes de estabelecer simbiose com leguminosas e fixar biologicamente N₂ foram descobertos (RIVAS et al., 2009).

A partir do século XX, outras características dos microrganismos começaram a ser estudadas como as propriedades fisiológicas e bioquímicas que foram então incorporadas ao sistema de classificação (ORLA-JENSEN, 1909; BUCHANAN, 1955). Com o passar do tempo, a quantidade de informações fenotípicas aumentava e o arquivamento dessas informações se tornava cada vez mais difícil. Diante desse cenário, na década de 1950, desenvolveu-se a taxonomia numérica (ROSSELO-MORÁ et al., 2001). A taxonomia numérica caracterizava-se por métodos numéricos, utilizando matrizes cujas medições eram exatas. Essas matrizes geradas agrupavam organismos de acordo com informações bioquímicas, metabólicas, enzimáticas e fisiológicas. Os seus resultados eram reproduzíveis, explícitos e objetivos na avaliação das relações fenotípicas entre os organismos avaliados, permitindo agrupá-los em grupos taxonômicos (SNEATH; SOKAL, 1973). No entanto, a taxonômica baseada em características morfológicas não permitiam discriminar diferentes espécies. Por isso diferentes avanços nos anos posteriores, os estudos baseados na biologia molecular foram capazes de diferenciar melhor, taxonomicamente, esses microrganismos.

Diferentes avanços aconteceram nessa área, como o conteúdo de G+C (conteúdo de Guanina e Citosina, em %mol no DNA) e a hibridização DNA-DNA (de LEY et al., 1970). A

hibridização DNA-DNA ainda é utilizada para determinar o quanto bactérias são similares ou não. A DDH (DNA-DNA hybridization) consiste na comparação, em pares, de dois genomas completos, apresentando a semelhança global entre eles (MARTENS et al., 2008). Concomitante as técnicas de hibridização DNA-DNA, surgiu a “taxonomia polifásica”. Essa tem como objetivo integrar características fenotípicas, genotípicas e filogenética de microrganismos (COLWELL, 1970) para que um consenso taxonômico seja atingido (VANDAMME et al., 1996). A taxonomia polifásica era utilizada até alguns anos atrás para a descrição de novas espécies de microrganismos e recentemente foi proposto a inclusão de informações do genoma da espécie nova que está sendo descrita e a comparação dele com genomas de estirpes tipo de espécies já descritas no gênero para a descrição de novas espécies dentro do grupo de rizóbios (de LAJUDIE et al., 2019).

Na década de 80 tem início a utilização de técnicas como amplificação do DNA e o seu sequenciamento em particular do gene 16S rRNA. Este revolucionou a classificação de bactérias (WOESE et al., 1990). O sequenciamento e a filogenia construída a partir desse gene ainda é bastante utilizada como uma referência primária no posicionamento taxonômico de bactérias. No entanto, devido as suas limitações, é apenas utilizado para o posicionamento filogenético a nível de gênero. Uma delas é que a quantidade de informação presente na sequência do gene 16S rRNA é insuficiente para identificar relações taxonômicas a nível de espécies e subespécies (STACKEBRANDT et al., 2002). No gênero *Bradyrhizobium* o alto grau de conservação e a alta similaridade entre as sequências desse gene faz com que as informações obtidas a partir dele sejam limitadas taxonomicamente (WILLEMS et al., 2001).

Uma nova abordagem que surgiu para compensar as limitações do DDH e do gene ribossomal foi a utilização de técnicas que definissem melhor as relações filogenéticas em procariontes. Dessa forma, surgiram novos marcadores moleculares, codificadores de proteínas, com maior nível de divergência entre as sequências que o gene 16S rRNA, mas conservados o suficiente para manter as informações genéticas (MARTENS et al., 2007). Esses marcadores, denominados de genes “housekeeping”, estão em diversos locus cromossomais e são distribuídos entre diversos táxons (STACKEBRANDT et al., 2002). Dentre os principais genes “housekeeping” utilizados no gênero *Bradyrhizobium* estão o *recA*, *atpD*, *dnaK*, *rpoB*, *gyrB*, *glnII*.

Nos anos 2000, para o auxílio na descrição de espécies de procariontes, uma nova técnica para comparação entre genomas surgiu. A partir dela tornou-se possível calcular a identidade média de nucleotídeos (Average nucleotide identity, ANI) (KONSTANTINIDIS e TIEDJE,

2005). Essa metodologia é capaz de comparar dois genomas, em pares e tem sido proposta como uma alternativa à hibridização DNA-DNA. Trabalhos recentes de descrição de espécies têm utilizado bastante a técnica do ANI (COSTA *et al.*, 2017, 2018) ; REJILI *et al.*, 2020; BROMFIELD; CLOTIER 2021; KLEPA *et al.*, 2021; AVONTUUR *et al.*, 2022). Para corroborar com a utilização do ANI como uma ferramenta acurada, pesquisas mostram que o ANI reflete de forma muito próxima o conceito tradicional da hibridização DNA-DNA para genomas de determinadas espécies (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; GORIS *et al.*, 2007). Os valores de ANI adotados para delimitação de espécies é de 95-96% (RICHTER; ROSSELLÓ-MORÁ, 2009). Esse percentual correspondente ao valor padrão de 70% do DDH para delimitar espécies.

Atualmente para a descrição de espécies tem sido utilizadas as informações primárias obtidas a partir do gene 16S rRNA. Porém, para resultados mais precisos e posicionamento filogenético mais acurado de estirpes em estudo, faz-se as análises de genes “*housekeeping*” que são avaliados isoladamente e de forma concatenada. Esta técnica é denominada de MLSA (multilocus sequence analysis) (GEVERS *et al.*, 2005). Por fim, para determinar, de fato, se estirpes em estudo pertencem a uma nova espécie realiza-se a comparação entre genomas através do ANI que consiste na comparação da estirpe em estudo com a ou as estirpes tipo mais próximas encontradas na MLSA. Resultados superiores a 95-96% indicam que os genomas das estirpes comparadas pertencem à mesma espécie e valores inferiores, a estirpe em estudo representa nova espécie.

Recentemente, de Lajudie *et al.* (2019) propuseram padrões mínimos para a descrição de novos gêneros e espécies do grupo dos rizóbios e agrobactérias e, para uma descrição adequada dos microrganismos, apenas as informações como: sequência genômica da estirpe tipo da espécie proposta e evidências da diferença dela de outras espécies através das sequências genômicas são necessárias. Outras informações como dados fenotípicos, testes de nodulação, genes *nod/nif* são recomendadas, mas não mandatórias.

2.4 Prospecção de genes

A ciência nas últimas décadas tem avançado no entendimento dos mecanismos genéticos utilizados pelas plantas que as tornam capazes de estabelecer simbiose com microrganismos (BROUGHTON et al., 2000; KRÖNAUER; RADUTOIU, 2021). De forma semelhante, diversos estudos estão sendo realizados com as bactérias capazes de formar estruturas nodulíferas, fixar N₂ e disponibilizá-lo para as plantas (MASSON-BOIVIN et al., 2009; WANG et al., 2012; LINDSTROM; MOUSAVI, 2020; ROY et al., 2020). Estes avanços se devem a disponibilidade de inúmeros genomas de diferentes gêneros e espécies de microrganismos capazes fixar nitrogênio biologicamente nos bancos de dados internacionais. Estas informações têm permitido o entendimento da evolução dos genomas que até tempos atrás não era entendido (ROCHA et al., 2008). Atualmente, o grande acúmulo e diversidade de dados genômicos se dão devido não só ao contínuo avanço nas técnicas de sequenciamento como também ao menor custo financeiro por genoma sequenciado.

Dentre as gerações de sequenciamento está o método Sanger (Sanger et al. 1977). Essa metodologia foi pioneira entre as técnicas de sequenciamento. Produzia leituras longas, mas com elevado custo (WORLEY et al., 2017). Contribuiu de forma expressiva para estudos genéticos, proporcionando o acesso a informações genéticas de diversos microrganismos, no entanto o custo para obtê-las exigia um trabalho intensivo que era restrito a poucos e grandes centros de sequenciamento (Land et al. 2015). A fim de solucionar tal limitação da metodologia de Sanger, novas tecnologia foram criadas Como as plataformas Solexa-Illumina e o Pirosequenciamento 454 Life, por exemplo, pertencem a segunda geração de sequenciamento.

Nas últimas décadas as técnicas de sequenciamento evoluíram e novas gerações surgiram. Entre elas estão a terceira (Ion Torrent e PacBio) e quarta geração (Nanopore). Essas tecnologias embora ofereçam vantagens como leituras mais longas, apresentam taxas de erro e baixa produção e por essa razão, ainda não são capazes de substituir o sequenciamento Illumina (Bleidorn 2016) que ainda é bastante utilizado devido ao baixo custo e menor taxa de erro que os sequenciamentos de terceira geração (HACKL et al., 2014; BLEIDORN, 2016). Atualmente, algumas pesquisas têm associado as duas tecnologias para montagem de genomas com sequencias mais completas e corretas. No entanto, as tecnologias de terceira geração e ferramentas de bioinformática estão em refinamento contínuo a fim de aumentar a precisão, tornando-se uma promessa para uma onda de avanços com grande impacto (HU et al. 2021).

A redução do custo do sequenciamento devido as tecnologias aplicadas geraram e têm gerado nos dias de hoje um enorme banco de dados genômicos e com isso, a utilização de ferramentas de bioinformática para a interpretação dessas informações é fundamental. Sem elas, não seria possível entender toda a quantidade de genomas sequenciados (DINIZ; CANDURI, 2017). No momento atual, existem diversas ferramentas e websites de bioinformática para processar as sequências genômicas. Dentre eles tem se a plataforma Kbase (<https://kbase.us/>), Rastseed (<https://rast.nmpdr.org/>), Microbeannotator (RUIZ-PEREZ et al., 2021), entre outros. Elas auxiliam na montagem, anotação e posterior análise das sequencias genômicas para os diferentes estudos a que se destinam. Na plataforma Kbase, por exemplo, é possível realizar análises para diferentes estudos, incluindo comparações entre genomas inclusos na plataforma.

A partir de genomas sequenciados, montados e posteriormente anotados, diversas informações podem ser obtidas. Ultimamente, elas têm sido utilizadas para diferentes fins e interpretações a respeito de como os mecanismos genéticos dos organismos procariotos permitem a sobrevivência deles na natureza. Alguns estudos, por exemplo, têm focado na identificação de segmentos codificadores de proteínas, comparações entre genomas para a identificação da função de determinados genes (WHISSTOCK; LESK, 2003; XIE et al., 2014), além do enfoque em inferências taxonômicas.

Existem diferentes estudos voltados para a genômica. Dentre eles, estão aqueles que estudam a composição nucleotídica, a ordem dos genes, relações sintênicas (relação de regiões cromossomais de genomas que compartilham uma ordem comum de genes homólogos provenientes de um ancestral comum (VERGARA et al., 2010; TANG et al., 2011), fornecem um bom entendimento sobre as similaridades e diferenças entre eles e com isso, informações a respeito de como se organizam e da evolução desses genomas (Wei et al. 2002). Informações como estas permitem certa compreensão das características que foram perdidas, modificadas ou adquiridas durante a adaptação de organismos a nichos ambientais específicos (FRANCIS et al., 2013; SUGAWARA et al., 2013). Outros estudos, por exemplo, com genômica comparativa mostraram que os cromossomos bacterianos estão sob pressões seletivas que moldaram demasiadamente sua organização. Os processos de transcrição, replicação e regulação da expressão gênica afetam a organização dos genes nos genomas (Abby and Daubin 2007). A comparação de dois genomas pode também permitir a identificação de um conjunto de genes ortólogos (genes provenientes de um mesmo ancestral e que são similares nos organismos comparados) (Koonin and Wolf 2008), a determinação de quais genes estão presentes ou ausentes

(Koonin and Mushegian 1996), além do comportamento biológico individual do organismo de acordo com o aparato genético que possui.

Outro aspecto que pode ser estudado a partir do sequenciamento genômico é a identificação de espécies de bactérias taxonomicamente relacionadas, de elementos genéticos únicos e a descoberta de rotas metabólicas e redes regulatórias (HE et al., 2007; TIAN et al., 2012). Além disso, no grupo de rizóbios, por exemplo, espécies têm sido descritas a partir da comparação par a par do genoma da nova espécie com a estirpe tipo da espécie mais próxima através do método ANI (de Lajudie et al., 2019).

Diante da importância do processo de FBN, diversas pesquisas têm sido realizadas com o genoma das bactérias pertencentes ao grupo dos rizóbios. Este compreende organismos de diferentes gêneros que possuem inúmeros genes e genomas depositados no banco de dados do NCBI. Atualmente, há 82 espécies descritas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e algumas delas têm sido utilizadas para o entendimento de quais mecanismos genéticos, como os genes *nod*, *nif*, *fix*, entre outros atuam no processo de fixação biológica de N₂ (MASSON-BOIVIN, 2009; ROCHE; ORENISK, 2016). Trabalhos têm mostrado que no grupo dos rizóbios, diversos genes estão envolvidos no processo de FBN (WANG et al., 2012; SHAMSELDIN, 2013; MASSON-BOIVIN AND SACHS, 2018). Os genes essenciais para a infecção, nodulação e fixação biológica de N₂ se encontram agrupados em módulos de simbiose que contêm os genes envolvidos na síntese e exportação do sinal de oligossacarídeos do fator Nod (*nod/nol/noe*) e os genes relacionados a síntese, montagem e processamento do complexo da nitrogenase (*nif/fix/fix*) (REMIGI et al., 2016). Recentemente, uma pesquisa com genes simbióticos em duas classes de rizóbios (Alfa e Beta), utilizando sequências genômicas, observou que genes envolvidos na nodulação como *nodIJ* estão inclusos na família dos genes de ATPase/permease da família Burkolderiace, o que sugere que estes dois genes, *nodI* e *nodJ*, se originaram da duplicação dos seus homólogos na classe Betaproteobactéria e que provavelmente foram transferidos para as Alfaproteobactérias (Jz et al. 2017).

2.5 Genes simbióticos e suas funções

Os genes *nod*, responsáveis pela produção dos chamados fatores nod e pela especificidade entre as bactérias e plantas, codificam oligômeros de quitina mono N-acilados na extremidade não redutora e funcionam como substituintes diferentes em ambas as extremidades da molécula. Na maioria dos rizóbios até então estudados, essas moléculas são

sintetizadas pelas enzimas codificadas pelos genes *nodABC* (ROCHE et al., 1996). O gene *nodC* codifica a enzima acetilglucosaminiltransferase que determina a síntese da estrutura de oligômero de quitina (GEREMIA et al., 1994). O gene *nodB* codifica uma quitooligossacarídeo deacetilase (JOHN et al., 1993). O gene *nodA* é requerido para N-acilação da cadeia principal de açúcar aminado (ATKINSON et al., 1994). Dentro do grupo de genes *nod* conservados, também estão o *nodD*, *nodI* e *nodJ*. A proteína do gene *nodD1* interage com os flavonóides liberados pelas plantas hospedeiras, dando origem a um fator transcricional que induz a expressão de genes de nodulação (GYORGYPAL et al., 1991; SCHLAMMAN et al., 1989, 1991), levando a produção dos fatores nod com uma estrutura central conservada (PETERS et al., 1986; LEROUGE et al., 1990). Os genes *nodIJ* estão envolvidos no transporte de fatores nod (CARDENAS et al., 1996; SPAINK et al., 1995). A fucose, uma substituição que ocorre com frequência, e a sua adição aos fatores Nod é codificada pelo gene *nodZ* em diversos rizóbios (LÓPEZ-LARA et al., 1996; MERGAERT et al., 1996; QUESADA-VINCENS et al., 1997; QUINTO et al., 1997). Simbiontes de soja como *B. japonicum*, *B. elkanii* secretam fatores Nod fucolisados (PERRET et al., 2000). O primeiro codifica uma N-methyltransferase (GEELLEN et al., 1993; GEELLEN et al., 1995) que é responsável por metilações e o segundo junto com o gene *NolO* controlam a carbamoilação em C-6 e C-3 ou C-4, respectivamente na N-acetil-D-glucosamina não redutora (JABBOURI et al., 1988).

Com relação aos genes relacionados ao complexo da nitrogenase, tem-se o gene *nifA* que é um elemento regulador positivo, *nifB* que é responsável pela síntese de FeMo-co, NifB-co é o doador específico de Fe e S para FeMo-co (FUHRMANN et al., 1985, NOTI et al., 1986), *nifH* gene que codifica a dinitrogenase redutase (TÖROK; KONDOROSI, 1981). Genes *nifDK* codificam as subunidades α e β da dinitrogenase (CORBIN et al., 1983; FISCHER; HENNECKE, 1984) e os genes *nifEN* que codificam a estrutura molecular para a montagem do cofator ferro-molibdênio (AGUILAR et al., 1990). Além desses genes *nif*, tem-se o gene *nifE* (MASEPOHL et al., 1989; AGUILAR et al., 1990) que forma com o *nifN* tetrâmeros de $\alpha_2\beta_2$ (KLIPP et al., 2004). Os genes *nifE* e *nifN* são necessários para a síntese de FeMo-co (KLIPP et al., 2004), *nifW* (ARIGONI et al., 1991) envolvido na estabilidade da dinitrogenase (KLIPP et al., 2004), *nifQ* oxidase do citocromo (LARANJO et al., 2014), *nifS* (EBELING et al., 1987) e *nifU* estão envolvidos na mobilização do S para síntese e reparo do agrupamento Fe-S (KLIPP et al., 2004). *nifZ* está envolvido na maturação da nitrogenase (Masson-Boivin et al., 2009) *nifT* possui função desconhecida. Um estudo com a estirpe *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 mostrou que ela possuía os seguintes genes *nif*: *nifA*, *nifB*, *nifH*, *nifD*,

nifK, *nifE*, *nifN*, *nifT*, *nifX*, *nifQ*, *nifW*, *nifZ*, *nifS*. As estirpes *Bradyrhizobium* sp. BTAi1; *Bradyrhizobium* sp. ORS278 apresentaram dois genes a mais que a espécie *B. japonicum* USDA 110, *nifU* e *nifV* (MASSON-BOIVIN et al., 2009).

Entre os genes também envolvidos na FBN estão os genes *fix*. Os genes *fixABCX* são responsáveis pela cadeia de transporte de elétrons para nitrogenase (GUBLER, 1986; EARL et al., 1987). Os Genes *fixNOPQ* são responsáveis pela oxidase do citocromo (BOISTARD et al., 1991). Os genes *fixLJ* (ANTHAMATTEN et al., 1992) e *fixK* são reguladores transcricionais. *fixGHIS* (KAHN et al., 1989; PREISIG et al., 1993) responsáveis pela captação e metabolismo do cobre (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2020). Tem-se também os genes *eps*, *kps* e *lps*. específicos de biossíntese de polissacarídeos de superfície que estão relacionados a simbiose entre rizóbios e leguminosas. Os genes *eps* são responsáveis pela formação de exopolissacarídeos. Esses, presentes na superfície das bactérias, são cruciais para o estabelecimento da simbiose bem-sucedida com leguminosas (KORUPSKA et al., 2006). O gene *kps* está relacionado ao polissacarídeo de antígeno K (KPS). Podem desempenhar papel na nodulação (PETROVICS et al., 1993) e está envolvido na proteção das bactérias contra substâncias produzidas por leguminosas para se protegerem de microrganismos como fagos (FRAYSSE et al., 2003). Os genes *lps*, responsáveis pela síntese de lipolissacarídeos (LPSs), podem desempenhar um papel nos estágios posteriores a morfogênese de nódulos que levam ao fenótipo fixador de nitrogênio (Fix^+) (JABBOURI et al., 1996; NOEL et al., 2000). Por fim, tem-se os genes *NolA* (GARCIA et al., 1996) em *Bradyrhizobium* que ativa a expressão do gene *nodD2* que suprime a atividade do *nodYABC* operon (LOH; STACEY, 2003). A tabela 1 mostra os genes relacionados a nodulação, fixação biológica de nitrogênio e produção de polissacarídeos e o estudo deles em organismos pertencentes ao grupo dos rizóbios e ao gênero *Bradyrhizobium*.

Tabela 1. Genes relacionados a FBN, artigos originais e recentes descrevendo esses genes e os organismos estudados (rizóbios e *Bradyrhizobium*)

Genes	Referências		Organismos estudados	
	Originais	Artigo recente	Rizóbios	<i>Bradyrhizobium</i>
Nodulação				
<i>nodA</i>	Atkinson et al. 1994	Laranjo et al., 2014	+	+
<i>nodB</i>	John et al. 1993	Laranjo et al., 2014	+	+
<i>nodC</i>	Geremia et al. 1994	Laranjo et al., 2014	+	+
<i>nodD</i>	Gyorgypal et al., 1991a; Schlaman et al., 1991	Laranjo et al., 2014	+	+
<i>nodIJ</i>	Cardenas et al. 1996; Spaink et al. 1995	Laranjo et al., 2014	+	+
<i>nodPQ</i>	Schwedock et al. 1990	Laranjo et al., 2014	+	-
<i>nodX</i>	Davis et al. 1988	Laranjo et al., 2014	+	-
<i>nodS</i>	Geelen et al. 1993; Geelen et al. 1995b	Shamseldin, 2013	+	+
<i>nodU</i>	Jabbouri et al. 1988	Shamseldin, 2013	+	+
<i>nodZ</i>	Lópes-lara 96; Mergaert et al. 1996; Quesada-Vincens et al. 1997).	Perret et al., 2000	+	+
<i>nolO</i>	Jabbouri et al. 1988	Perret et al., 2000	+	+
<i>nolA</i>	Garcia et al. 1996	Perret et al., 2000	+	+
Fixação biológica de nitrogênio				
<i>nifH</i>	Török and Kondorosi 1981	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifD</i>	Fischer and Hennecke 1984	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifK</i>	Fischer and Hennecke 1984	Masson-Boivin et al., 2009	+	+

<i>nifE</i>	Masepohl et al. 1989; Aguilar et al. 1990	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifN</i>	Aguilar et al. 1987; Aguilar et al. 1990	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifX</i>	Hennecke, 1990	Shamseldin, 2013	+	-
<i>nifS</i>	Ebeling et al. 1987	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifU</i>	Klipp et al. 2004	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifW</i>	Arigoni et al. 1991	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifZ</i>	Paul and Merrick 1989	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifA</i>	Hennecke, 1990	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>nifB</i>	Fuhrmann et al. 1985	Shamseldin, 2013		
<i>nifQ</i>	Klipp et al. 2004	Laranjo et al., 2014	+	+
<i>nifT</i>	Klipp et al. 2004	Masson-Boivin et al., 2009	+	+
<i>fixABCX</i>	Gubler 1986; EARL et al. 1987	Lindström and Mousavi, 2019	+	+
<i>fixNOPQ</i>	Boistard et al. 1999; Preisig et al. 1993	Lindström and Mousavi, 2019	+	+
<i>fixLJ</i>	David et al. 1988; Anthamatten et al. 1991	Lindström and Mousavi, 2019	+	+
<i>fixK</i>	Batut et a. 1989	Lindström and Mousavi, 2019	+	+
<i>fixGHIS</i>	Kahn et al. 1989; Preisig et al. 1993	Lindström and Mousavi, 2019	+	+
Produção de polissacarídeos				
<i>eps</i>	Gray; Rolfe 1991	Wang et al., 2018	+	+

<i>kps</i>	Reus et al. 1993	Downie, 2010	+	-
<i>lps</i>	Frosberg et al. 1998	Gibson et al., 2008	+	+

* O sinal positivo indica que existem estudos com rizóbios e, especificamente, *Bradyrhizobium*. O sinal negativo representa a ausência de estudos com esses genes nos organismos presentes na tabela.

O entendimento de todo aparato genético para o funcionamento da FBN avançou muito nos últimos anos, no entanto ainda é complexo o entendimento de quais genes os microrganismos ativam ou não no processo diante dos estímulos emitidos pela planta hospedeira. Inclusive, essa interação pode ter influências externas que podem influenciar no sucesso da interação entre os simbioses, incluindo sua especificidade e eficiência no processo da FBN. Mas, quanto maior o número de genomas sequenciados de microrganismos pertencentes ao grupo dos rizóbios e mais especificamente de bactérias pertencentes ao gênero tão importante como o *Bradyrhizobium* maior será a capacidade da ciência de corroborar e contribuir para o manejo sustentado da FBN, visto que pode ser possível, no futuro, identificar os genes essenciais para a eficiência do processo de FBN e com isso identificar previamente esses genes nos microrganismos, selecioná-los de forma rápida e difundir-los para o uso agrícola e até florestal.

Por isso, o presente trabalho selecionou 38 estirpes de *Bradyrhizobium* capazes de nodular três leguminosas diferentes: soja, feijão-fava e amendoim forrageiro. Estas leguminosas foram selecionadas devido a importância que possuem na agricultura. A soja é uma cultura de grande destaque visto que é uma “commodity” extremamente versátil pois dela podem ser extraídos óleo, grãos, farelo, entre outros produtos. Além disso, é uma das culturas mais produzidas mundialmente. A seleção do feijão-fava se deu por ser a segunda espécie do gênero *Phaseolus* mais consumido no mundo e o amendoim forrageiro porque apresenta características importantes como sua utilização como espécie forrageira e também porque é muito utilizada para consórcio com outras espécies uma vez que é bastante tolerante ao sombreamento.

Atualmente, existem 13 espécies de *Bradyrhizobium* descritas capazes de formar simbiose com a soja. São elas : *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. huanghuaihaiense*, *B. ganzhouense*, *B. diazoefficiens*, *B. daqingense*, *B. ottawaense*, *B. amphicarphaeae*, *B. symbiodeficiens*, *B. diversitatis*, *B. cosmicum*, *B. septentrionale*, *B. quebecense* (JORDAN 1982;

XU et al., 1995; WANG et al., 2013; ZHANG et al., 2012; DELAMUTA et al., 2013; LU et al., 2014; YU et al., 2014; BROMFIELD et al., 2019; BROMFIELD et al., 2020; WASAIHARA et al., 2020; KLEPA et al., 2021; BROMFIELD et al., 2021). Além destas, outras duas espécies de *Bradyrhizobium* isoladas de outras plantas hospedeiras foram eficientes em estabelecer simbiose com a soja: *B. ferriligni* CCBAU 51502^T e *B. shewense* ERR11^T (YAO et al., 2015; ASERSE et al., 2017). Com relação ao feijão fava, existem duas espécies descritas de *Bradyrhizobium* capazes de formar simbiose com esta leguminosa: *B. icense* e *B. paxllaeri* (DURÁN et al., 2014). Uma outra espécie capaz de se associar ao feijão fava simbioticamente, mas isolada de outra planta hospedeira é a *B. yuanmingense* (ORMENO-ORRILLO, 2006). No que diz respeito ao amendoim forrageiro, no momento presente, não existem espécies descritas de *Bradyrhizobium* capazes de estabelecer simbiose com essa leguminosa na literatura.

A seleção das 38 estirpes de *Bradyrhizobium* foi realizada considerando-se as diferentes regiões brasileiras das quais estas estirpes foram isoladas. Dessa forma, pode ser possível entender se os posicionamentos filogenéticos dos seus genomas e de seus genes responsáveis pela FBN (*nod*, *nif*, *fix*), estariam relacionados com os locais de onde as estirpes foram isoladas. Além disso, o estudo desses isolados, de diferentes regiões brasileiras, pode contribuir para que o conhecimento da diversidade de microssimbiontes dessas espécies vegetais (amendoim forrageiro, soja e feijão-fava) seja ampliado.

REFERÊNCIAS

- ABBY, Sophie; DAUBIN, Vincent. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 135–141, 2007.
- AGUILAR, O. Mario et al. The *nifEN* genes participating in FeMo cofactor biosynthesis and genes encoding dinitrogenase are part of the same operon in *Bradyrhizobium* species. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 224, n. 3, p. 413-420, 1990.
- ALVES, Bruno JR; BODDEY, Robert M.; URQUIAGA, Segundo. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p. 1-9, 2003.
- ANTHAMATTEN. Untersuchungen zur Regulation der symbiontischen N₂-Fixierung in *Bradyrhizobium japonicum*: Entdeckung und Charakterisierung der *fixI*-, *fixK*- und *fixN*-Gene. Ph.D. dissertation ETH 9819. Eidgenössische Technische Hochschule, 1992
- ARIGONI, Fabrizio et al. Nucleotide sequence of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571: similarity of the *fixB* product with eukaryotic flavoproteins, characterization of *fixX*, and identification of *nifW*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 225, n. 3, p. 514-520, 1991
- ASERSE, Aregu Amsalu et al. Draft genome sequences of *Bradyrhizobium shewense* sp. nov. ERR11T and *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071T. **Standards in genomic sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2017.
- ATKINSON, E. Morrey et al. Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 18, p. 8418-8422, 1994.
- AVONTUUR, Juanita R. et al. *Bradyrhizobium altum* sp. nov., *Bradyrhizobium oropedii* sp. nov. and *Bradyrhizobium acaciae* sp. nov. from South Africa show locally restricted and pantropical *nodA* phylogeographic patterns. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 167, p. 107338, 2022.
- BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 6, p. 616-639, 2014.
- BLEIDORN, Christoph. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. **Systematics and biodiversity**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2016.
- BOISTARD, P. et al. Regulation of nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*. In: **Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1**. Springer, Dordrecht, 1991. p. 195-202
- BROMFIELD, Eden SP; CLOUTIER, Sylvie; NGUYEN, Hai DT. Description and complete genome sequences of *Bradyrhizobium symbiodeficiens* sp. nov., a non-symbiotic bacterium associated with legumes native to Canada. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 1, p. 442, 2020.

BROMFIELD, Eden SP; CLOUTIER, Sylvie. *Bradyrhizobium septentrionale* sp. nov. (sv. septentrionale) and *Bradyrhizobium quebecense* sp. nov. (sv. septentrionale) associated with legumes native to Canada possess rearranged symbiosis genes and numerous insertion sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 6, 2021.

BROUGHTON, William J.; JABBOURI, Saïd; PERRET, Xavier. Keys to symbiotic harmony. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5641-5652, 2000.

BUCHANAN, R.E. Taxonomy. Annual Review of Microbiology v. 9, p.1- 20,1955.
Cardenas, L., J. Dominguez, O. Santana, and C. Quinto. 1996. The role of *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. **Gene** 173:183–187.

CHUN, Jongsik et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018

COLWELL, R.R Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology** v.104, p.410–433,1970.

CORBIN, David; BARRAN, Leslie; DITTA, Gary. Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 10, p. 3005-3009, 1983.

COSTA, Elaine M. et al. *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. **Archives of microbiology**, v. 200, n. 5, p. 743-752, 2018.

COSTA, Elaine M. et al. Efficient nitrogen-fixing bacteria isolated from soybean nodules in the semi-arid region of Northeast Brazil are classified as *Bradyrhizobium brasilense* (symbiovar *sojae*). **Current Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 1746-1755, 2020.

DE LAJUDIE, Philippe M. et al. 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, Jakeline Renata Marçon et al. *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. Pt_12, p. 4424-4433, 2015.

DELAMUTA, Jakeline Renata Marçon et al. *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.

LEY, J. de; CATTOIR, H.; REYNAERTS, A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. **European Journal of Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 133-142, 1970.

- DINIZ, Wellison Jarles da Silva; CANDURI, Fernanda. Bioinformatics: an overview and its applications. **Genet Mol Res**, v. 16, n. 1, p. 10.4238, 2017.
- DOWNIE, J. Allan. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 150-170, 2010.
- DURAN, David et al. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_6, p. 2072-2078, 2014.
- EARL, C. D.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC*, and *fixX* genes. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 1127-1136, 1987
- EBELING, Sabine et al. Identification of *nifE*-, *nifN*-and *nifS*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 207, n. 2, p. 503-508, 1987.
- FARIAS, Thiago Palhares et al. Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão State. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 387-395, 2016.
- FISCHER, Hans-Martin; HENNECKE, Hauke. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 209, n. 3, p. 621-626, 1987.
- FONSECA, Eduardo da Silva et al. The microbiome of Eucalyptus roots under different management conditions and its potential for biological nitrogen fixation. **Microbial ecology**, v. 75, n. 1, p. 183-191, 2018.
- FRANCIS, Felix et al. Comparative genomic analysis of two *Burkholderia glumae* strains from different geographic origins reveals a high degree of plasticity in genome structure associated with genomic islands. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 288, n. 3-4, p. 195-203, 2013
- FRANK, B. Ueber dies pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Stuttgart, v. 7, n. 8, p. 332-346, 1889.
- FROSBERG, Lennart S.; CARLSON, Russell W. The Structures of the Lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* Strains CE358 and CE359: THE COMPLETE STRUCTURE OF THE CORE REGION OF R. ETLILIPOPOLYSACCHARIDES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 5, p. 2747-2757, 1998.
- FUHRMANN, Martin; FISCHER, Hans-Martin; HENNECKE, Hauke. Mapping of *Rhizobium japonicum* *nifB*-, *fixBC*-, and *fixA*-like genes and identification of the *fixA* promoter. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 199, n. 2, p. 315-322, 1985.
- GARCIA, Minviluz et al. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 9, n. 7, p. 625-636, 1996.

- GEVERS, DIRK et al. Reevaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005
- GEDDES, Barney A.; ORESNIK, Ivan J. The mechanism of symbiotic nitrogen fixation. **The mechanistic benefits of microbial symbionts**, p. 69-97, 2016.
- GEELLEN, Danny et al. NodS is an S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase that methylates chitooligosaccharides deacetylated at the non-reducing end. **Molecular microbiology**, v. 17, n. 2, p. 387-397, 1995.
- GEELLEN, Danny et al. Identification of *nodS* genes in Nod locus 1 of Azorhizobium caulinodans: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. **Molecular microbiology**, v. 9, n. 1, p. 145-154, 1993.
- GEREMIA, Roberto A. et al. The *NodC* protein of Azorhizobium caulinodans is an N-acetylglucosaminyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 7, p. 2669-2673, 1994.
- GIBSON, Katherine E.; KOBAYASHI, Hajime; WALKER, Graham C. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 413, 2008.
- GORIS J. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 1, p. 81-91, 2007.
- GUBLER, Marcel; HENNECKE, Hauke. *fixA*, B and C genes are essential for symbiotic and free-living, microaerobic nitrogen fixation. **FEBS letters**, v. 200, n. 1, p. 186-192, 1986.
- GYORGYPAL, Z., Kiss, G. B., and Kondorosi, A., Transduction of plant signal molecules by the Rhizobium NodD proteins, **BioEssays**, 13, 575, 1991a.
- HACKL, Thomas et al. proovread: large-scale high-accuracy PacBio correction through iterative short read consensus. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3004-3011, 2014.
- HE, Yong-qiang et al. Open Access Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, **Genome biology**, v. 8, n. 10, p. 1-26, 2007
- HELENE, Luisa Caroline Ferraz et al. *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1827-1834, 2017.
- HENNECKE, Hauke. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. **FEBS letters**, v. 268, n. 2, p. 422-426, 1990.

HU, Taishan et al. Next-generation sequencing technologies: An overview. **Human Immunology**, v. 82, n. 11, p. 801-811, 2021.

HUNGRIA, Mariangela; MENDES, Iêda Carvalho. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? 10. 2015.

ISLAM et al. *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, p. 1416-1429, 2008.

JOHN, Michael et al. *Rhizobium NodB* protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 625-629, 1993.

LOH, John; STACEY, Gary. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 1, p. 10-17, 2003.

KAHN, Daniel et al. *Rhizobium meliloti* fixGHI sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 2, p. 929-939, 1989.

KLEPA, Milena Serenato et al. *Bradyrhizobium agreste* sp. nov., *Bradyrhizobium glycinis* sp. nov. and *Bradyrhizobium diversitatis* sp. nov., isolated from a biodiversity hotspot of the genus *Glycine* in Western Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 3, 2021.

KLIPP, Werner et al. (Ed.). **Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria**. Springer Science & Business Media, 2004.

KONSTANTINIDIS, Konstantinos T.; TIEDJE, James M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 7, p. 2567-2572, 2005.

KOONIN E. V.; WOLF Y. I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 21, p. 6688-6719, 2008.

KOONIN E. V.; MUSHEGIAN A. R. Complete genome sequences of cellular life forms: glimpses of theoretical evolutionary genomics. **Current opinion in genetics & development**, v. 6, n. 6, p. 757-762, 1996.

KRÖNAUER, Christina; RADUTOIU, Simona. Understanding Nod factor signalling paves the way for targeted engineering in legumes and non-legumes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 62, p. 102026, 2021.

LAND, Miriam et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional & integrative genomics**, v. 15, n. 2, p. 141-161, 2015.

- LARANJO, Marta; ALEXANDRE, Ana; OLIVEIRA, Solange. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the Mesorhizobium genus. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 2-17, 2014.
- LEHMANN, K. B. e NEUMANN R. O. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bacteriologischen Diagnostik. Teil 11. Verlag von J. F. Lehmann, Munich, 1986
- LEROUGE, Patrice et al. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. **Nature**, v. 344, n. 6268, p. 781-784, 1990.
- LINDSTRÖM, Kristina; MOUSAVI, Seyed Abdollah. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1314-1335, 2020.
- LÓPEZ-LARA, Isabel M. et al. *NodZ* of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. **Molecular microbiology**, v. 21, n. 2, p. 397-408, 1996.
- MARTENS, M. et al. 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.; VOS, P.de e 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, p. 200-214, 2008.
- MASEPOHL, Bernd; KLIPP, Werner; PÜHLER, Alfred. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 212, n. 1, p. 27-37, 1988.
- MASSON-BOIVIN, Catherine et al. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in microbiology**, v. 17, n. 10, p. 458-466, 2009.
- MASSON-BOIVIN, Catherine; SACHS, Joel L. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 7-15, 2018.
- MERGAERT, Peter et al. Fucosylation and arabinosylation of nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *nolKnodZ* as well as *noeC* and/or downstream genes. **Molecular microbiology**, v. 21, n. 2, p. 409-419, 1996.
- MICHEL, Daniele C. et al. *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 5, p. 657-664, 2017.
- MICHEL, Daniele C. et al. *Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 1135-1141, 2020.
- MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative 53 polyacrylamide gel electrophoresis of

their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p

NOTI, J. D. et al. Organization and characterization of genes essential for symbiotic nitrogen fixation from *Bradyrhizobium japonicum* I110. **Journal of bacteriology**, v. 167, n. 3, p. 774-783, 1986.

OLIVEIRA, Dâmiany Pádua et al. Selection of elite *Bradyrhizobium* strains by biometric techniques for inoculation in cowpea. **Soil Science Society of America Journal**, v. 84, n. 4, p. 1125-1138, 2020.

ORLA-JENSEN S. Die Hauptlinien der natürlichen Bakteriensystems. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II**, v.22, p. 305–46, 1909.

ORMENO-ORRILLO, Ernesto et al. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 3, p. 253-262, 2006.

PEIX, Alvaro et al. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015.

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

PETERS, N. Kent; FROST, John W.; LONG, Sharon R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v. 233, n. 4767, p. 977-980, 1986.

PREISIG, Oliver; ANTHAMATTEN, Denise; HENNECKE, Hauke. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3309-3313, 1993.

QUESADA-VINCENS, Dolores et al. *Rhizobium* sp. strain NGR234 *NodZ* protein is a fucosyltransferase. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 16, p. 5087-5093, 1997

QUINTO, Carmen et al. Bacterial nodulation protein *NodZ* is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 9, p. 4336-4341, 1997.

REJILI, Mokhtar et al. *Bradyrhizobium hipponense* sp. nov., isolated from *Lupinus angustifolius* growing in the northern region of Tunisia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5539-5550, 2020.

REMIGI, Philippe et al. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 1, p. 63-75, 2016.

REUHS, B. L.; CARLSON, R. W.; KIM, JS204758. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally

- analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3570-3580, 1993.
- RICHTER, Michael; ROSSELLÓ-MÓRA, Ramon. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126-19131, 2009.
- RIVAS, Raul et al. Martens M, Lajudie P, Willems A Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic Applied Microbiology** 32:101–110, 2009
- ROCHA E. PC. Evolutionary patterns in prokaryotic genomes. **Current opinion in Microbiology**, v. 11, p. 454-460, 2008.
- ROCHE, Philippe et al. The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 26, p. 15305-15310, 1996.
- ROSSELLÓ-MORA, Ramon; AMANN, Rudolf. The species concept for prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.
- ROY, Sonali et al. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, v. 32, n. 1, p. 15-41, 2020.
- SHAMSELDIN, Abdelaal. The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation—review. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 84-94, 2013.
- RUIZ-PEREZ, Carlos A.; CONRAD, Roth E.; KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. MicrobeAnnotator: a user-friendly, comprehensive functional annotation pipeline for microbial genomes. **BMC bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 1-16, 2021.
- SANGER, Frederick; NICKLEN, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SCHLAMMAN, H. R. et al. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 14, p. 4277-4287, 1991.
- SCHLAMMAN, H. R. et al. Subcellular localization of the *nodD* gene product in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 9, p. 4686-4693, 1989.
- SILVA, Flavia V. et al. *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazonian rainforest soils. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_7, p. 2358-2363, 2014.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: F. H. Freeman & Co, p. 573, 1973.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006.

SPAINK, Herman P.; WIJFJES, A. H.; LUGTENBERG, B. J. *Rhizobium NodI* and *NodJ* proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 21, p. 6276-6281, 1995

STACKEBRANDT, E. et al Report of the ad hoc 65 committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52p. 1043-1047. 2002.

STONE, Bram W. et al. Nutrients cause consolidation of soil carbon flux to small proportion of bacterial community. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2021.

SUGAWARA, Masayuki et al. Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 *Sinorhizobium* strains comprising five genospecies. **Genome Biology**, v. 14, n. 2, p. R17, 2013.

TANG, Haibao et al. Screening synteny blocks in pairwise genome comparisons through integer programming. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2011.

TIAN, Chang Fu et al. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 22, p. 8629-8634, 2012. x

TÖRÖK, István; KONDOROSI, Ádám. Nucleotide sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 21, p. 5711-5724, 1981

VANDAMME, P. E PEETERS, C. Time to revisit polyphasic taxonomy. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 57-65, 2014.

VERGARA, Ismael A.; CHEN, Nansheng. Large synteny blocks revealed between *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* genomes using OrthoCluster. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2010.

WANG, Dong et al. Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 3, p. 334-342, 2012.

WANG, Jing Yu et al. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt_2, p. 616-624, 2013.

WANG, Qi; LIU, Jinge; ZHU, Hongyan. Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 313, 2018.

WASAI-HARA, Sawa et al. Strains of *Bradyrhizobium cosmicum* sp. nov., isolated from contrasting habitats in Japan and Canada possess photosynthesis gene clusters with the hallmark of genomic islands. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5063, 2020.

WEI, Liping et al. Comparative genomics approaches to study organism similarities and differences. **Journal of biomedical informatics**, v. 35, n. 2, p. 142-150, 2002.

WILLEMS, Anne; COOPMAN, Renata; GILLIS, Monique. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of Bradyrhizobium species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 111-117, 2001.

WHISSTOCK, James C.; LESK, Arthur M. Prediction of protein function from protein sequence and structure. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 36, n. 3, p. 307-340, 2003.

WOESE, C. R.; KANDLER.; M. L. WHEELIS. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 87, n.12, p. 4576-4579, 1990.

YAO, Yao et al. *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.

YU, Xiumei et al. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt 9, p. 3202, 2014.

XIE, Jian-Bo et al. Comparative genomic analysis of N₂-fixing and non-N₂-fixing *Paenibacillus* spp.: organization, evolution and expression of the nitrogen fixation genes. **PLoS genetics**, v. 10, n. 3, p. e1004231, 2014.

ZHENG, J. Z. et al. The structure and evolution of beta-rhizobial symbiotic genes deduced from their complete genomes. **Immunome research**, v. 13, n. 2, 2017.

ZILLI, Jerri E. et al. *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_12, p. 3950-3957, 2014.

ZILLI, Jerri Édson et al. The importance of denitrification performed by nitrogen-fixing bacteria used as inoculants in South America. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 5-24, 2020.

ZILLI, Jerri Édson et al. Biological N₂ fixation and yield performance of soybean inoculated with Bradyrhizobium. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, n. 3, p. 323-336, 2021.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1- *Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont

Artigo publicado na revista Archives of Microbiology

***Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont**

Daniele Cabral Michel¹ · Amanda Azarias Guimarães¹ · Elaine Martins da Costa² · Teotonio Soares de Carvalho¹ · Eduardo Balsanelli³ · Anne Willems⁴ · Emanuel Maltempi de Souza³ · Fatima Maria de Souza Moreira¹

Received: 29 August 2019 / Revised: 24 January 2020 / Accepted: 31 January 2020 / Published online: 15 February 2020

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

This study describes two *Bradyrhizobium* strains, UFLA03-164^T and UFLA03-153, which share more than 99% sequence similarity of the 16S rRNA with the type strains of 15 species in this genus. The concatenation of three housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, and *dnaK*) indicated that both strains formed a single clade separate from known *Bradyrhizobium* species. *B. viridifuturi*, represented by SEMIA 690^T, is the closest neighboring species (96.2%). Low (< 92%) average nucleotide identity (ANI) was observed between strain UFLA03-164^T and any of the closest species on the phylogenetic trees based on concatenated housekeeping genes. The DNA G+C content of UFLA03-164^T is 63.25%. Phenotypic characteristics were determined for both UFLA strains. Based on the data, the two strains represent a new species for which the name *Bradyrhizobium uaiense* is proposed, with UFLA03-164^T (= LMG 31509^T) as type strain.

Keywords *Bradyrhizobium* · Plant growth-promoting bacteria · Biological nitrogen fixation · Phylogeny · Taxonomy

Communicated by Erko Stackebrandt.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01827-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Fatima Maria de Souza Moreira moreira@ufla.br

¹ Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos Do Solo, Departamento de Ciência Do Solo,

- 2 Universidade Federal Do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Piauí 64900-000, Brazil
- 3 Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, Paraná 81531990, Brazil
- 4 Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Microbiology, Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Ghent, Belgium

Introduction

Food for a rapidly growing human population and reduction of human impacts on the environment require the development of agricultural technologies promoting higher sustainability, higher yield, and lower cost. A promising strategy to achieve these goals is the use of microorganisms in agriculture for they are able to promote plant growth through several processes, including biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, plant hormone production, and disease suppression. This reduces the need for industrial agricultural inputs and lessens their potential impact on the environment.

Inoculation of *Bradyrhizobium* strains on soybean (*Glycine max* L.) in Brazil is a notable example of the use of this technology, as it completely eliminated the need for application of synthetic nitrogen fertilizer on this crop; all the N required by the plant is provided by the bacteria. In addition to their nitrogen-fixing ability, several bacterial strains within the *Bradyrhizobium* genus are also able to solubilize different forms of phosphate and produce indole acetic acid (IAA) (Marra et al. 2011; Oliveira-Longatii et al. 2014).

The symbiotic efficiency of two *Bradyrhizobium* strains, UFLA03-164^T and UFLA03-153, as nitrogen-fixing bacteria in symbiosis with cowpea (*Vigna unguiculata* L.) has been assessed in experiments using soil pots. Both strains were efficient cowpea symbionts, since the plants inoculated with the strains grew at the same rate as those in the nitrogen-fertilized controls or those inoculated with the strain INPA 03-11B, already approved by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento—MAPA (Brazilian Ministry of Agriculture) (Soares et al. 2014). In addition, both UFLA03-164^T and UFLA03-153 are able to tolerate high aluminum (Al^{3+}) concentrations (up to $20 \text{ mmol}_c \text{ Al}^{3+} \text{ dm}^{-3}$) and can grow in pH ranging from 5.0 to 6.8, which is important for their survival under the conditions naturally found in tropical soils (Soares et al. 2014). Besides, both strains were resistant to 11 of the 12 antibiotics tested, which may make them more competitive in the soil ecosystem and UFLA03-164^T

was able to synthesize IAA in vitro both when L-tryptophan was added to the culture medium and when L-tryptophan was absent (Oliveira-Longatti et al., 2014).

Recent research has shown that both UFLA03-164^T and UFLA03-153 promote cowpea growth in field experiments. They led to increased yield in cowpea and were more efficient in biological nitrogen fixation than the strains already approved by MAPA as cowpea inoculants (UFLA03-84 and INPA03-11B) (Farias et al. 2016a). In addition, in field experiments in the semi-arid region of the state of Maranhão, Brazil, these two strains induced higher values of shoot dry matter compared to several other strains; and their efficiency in promoting cowpea growth was equivalent to that of the control treatment receiving nitrogen fertilizer application (Farias et al. 2016b). Other studies with the strain UFLA03-164^T in different locations, crop seasons, and years showed that even in some stressful environments, the strain UFLA03-164^T is stable and well adapted, maintaining high and stable cowpea yields, similar to those obtained from the inoculant already approved for cowpea (INPA03-11B) or the nitrogen control (Oliveira et al. unpublished data).

These results show that the strains UFLA03-164^T and UFLA03-153 can be considered elite strains since they have provided excellent results in experiments on biological nitrogen fixation (BNF) in different contexts and environments. Besides, they behave well under different adverse conditions. Therefore, we performed studies to meet minimal standards for an adequate description as new rhizobial species, as recommended by Lajudie et al. (2019). This included the average nucleotide identity (Konstantinidis and Tiedje 2005), which showed a dissimilarity compatible with differences at the species level between *B. uaiense* and other *Bradyrhizobium* species.

Materials and methods

Origin of the strains

The strains UFLA03-164^T and UFLA03-153 were isolated from nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivated in soil samples originating from a bauxite mining area of ALCOA Alumínio S/A in the municipality of Poços de Caldas, MG, Brazil (21° 47' 18" S, 46° 33' 45" W) (Melloni et al. 2006). The strain UFLA03-164^T was obtained from cowpea grown in the soil of a newly mined region covered with pigeon pea (*Cajanus cajan*), molasses grass (*Melinis minutiflora*), and native arboreal species. The strain UFLA03-153 was isolated from cowpea

grown in the soil of a rehabilitated area (6 years) covered with *Mimosa scabrella* Benth. and molasses grass (Melloni et al. 2006).

Medium 79 (Fred and Waksman 1928) was used for isolation and characterization of these strains. These two strains have been deposited in the UFLA bacteria collection of the Department of Soil Biology, Microbiology, and Biological Processes at the Universidade Federal de Lavras—UFLA (Federal University of Lavras), Brazil, and in the BCCM/ LMG bacteria collection at Ghent University, Belgium (UFLA03-164^T = LMG 31509^T; UFLA03-153 = LMG 31511).

Phylogenetic analysis

DNA was extracted from the strains through the alkaline lysis method (Niemann et al. 1997). The sequences analyzed for genetic characterization were 16S rRNA genes, housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *glnII*, *rpoB*), and symbiotic genes (*nodC* and *nifH*). The primers, sequence cycles, and amplification of the 16S rRNA (1221 bp) sequence of both UFLA strains are presented in Oliveira-Longatti et al. (2014). Partial sequences of *recA* (375 bp) and *gyrB* (516 bp) for both strains were obtained according to Ribeiro et al. (2015). The sequencing of *dnaK* (223 bp) and *atpD* (429 bp) for the two strains was reported by Guimarães et al. (2015). The genes *glnII* (480 bp) and *rpoB* (435 bp) were obtained from the UFLA03-164^T genome with the accession number VKHP00000000. Amplification and sequencing of the *nodC* symbiotic gene followed the method of Sarita et al. (2005), considering the modifications made by De Meyer et al. (2011). The *nifH* (238 bp) gene was amplified and sequenced following the instructions provided by Gaby and Buckley (2012).

Concatenated housekeeping gene sequences were analyzed according to the availability of sequences of all type strains of the *Bradyrhizobium* species deposited in Genbank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) and compared to UFLA03-164^T and UFLA03-153 strains. This analysis included *recA*, *gyrB*, and *dnaK* for both strains. In addition, analysis of the concatenated *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *glnII*, and *rpoB* genes was performed with only the type strain UFLA03-164^T. The strain UFLA03-153 was not included in this more robust phylogenetic tree (Supplementary material Fig. S1) because its *rpoB*, *atpD*, and *glnII* sequences are not available.

The multiple sequence alignment was constructed using MUSCLE (Edgar 2004). The alignment was edited, and phylogenetic analysis of the sequences was carried out using the MEGA7 software package (Kumar et al. 2016). Phylogenetic trees were constructed by the neighbor joining (Saitou and Nei 1987) and maximum

likelihood (ML) (Felsenstein 1981) statistical methods using the Tamura 3-parameter model (Tamura 1992). The strength of each topology was checked through 1000 bootstrap replications. The construction methods had similar phylogenetic tree topologies, but only the ML results are shown in this study. The concatenation of housekeeping genes was made in Seaview version 4 software (Gouy et al. 2010).

The sequences of all type strains of *Bradyrhizobium* species deposited in GenBank (NCBI) were included in each phylogenetic tree. For some *Bradyrhizobium* species, 16S rRNA and the housekeeping genes were extracted from their genomes. The genes and genome accession number of each strain are shown in figures and in Table S1.

Average nucleotide identity (ANI) and G+C content

To obtain more accurate taxonomic classification, measures of genome relatedness, such as the average nucleotide identity (ANI) (Konstantinidis and Tiedje 2005) are being widely used to identify new bacterial species (Yao et al. 2015; Delamuta et al. 2016; Costa et al. 2017). These measures are reliable alternatives to DNA–DNA hybridization (DDH) (De Ley 1968).

Regarding the use of genomes in prokaryotic taxonomy, de Lajudie et al. (2019) proposed that for an adequate description of new rhizobial species, at least the following minimum standards should be met: the availability of the genome sequence for the type strain, and provision of evidence for differentiation from other rhizobial species based on genome sequences of the type strains. For that reason, the genome of UFLA03-164^T was sequenced to support the designation of our new species.

The UFLA03-164^T strain was grown in liquid Medium 79. After that, the DNA from 10⁹ bacterial cells was purified using the phenol–chloroform extraction protocol. The DNA library was constructed from 1 ng of total DNA for Illumina sequencing. The Nextera XT kit (Illumina) was used for preparation of this library. Pair-end reads (2 × 250 bases) were sequenced using the MiSeq Reagent kit 500v2 (Illumina) on the MiSeq platform (Illumina). De novo assembly of the UFLA03-164^T sequence was obtained through SPADes 3.12 (Bankevich et al. 2012). The quality and completeness of the genome obtained was checked using CheckM (Parks et al. 2015).

ANI was used to compare the genome sequence of the UFLA03-164^T strain (VKHP00000000) obtained in this study with the genomes of the following type strains: *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T (NZ_LFLZ00000000.1), *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (NZ_LGTB00000000.1), *B. embrapense* CNPSo 2833^T (ASM118923v2), *B. elkanii* USDA 76^T (ASM37914v1), *B. pachyrhizi* PAC48^T (SAMN03782120), and *B. brasilense* UFLA03-321^T

(MPVQ00000000). These type strains were chosen because of their relatedness to UFLA03-164^T, as indicated by the phylogenetic tree based on six concatenated housekeeping genes. ANI values were calculated using the MUMmer4 system (Marçais et al. 2018).

The G+C content of UFLA03-164^T was determined based on the draft genome obtained in this study.

Phenotypic characterization

In this study, the two UFLA strains were cultured in Medium79 at 28 °C for 7 days at different temperatures (15, 20, 34,37, 38, and 40 °C) and pH levels (4, 5.5, 6.8, 8, 9, and 10), following Florentino et al. (2010). Their ability to grow at several NaCl concentrations (w/v) (0.5, 0.75, and 1%) was evaluated by Guimarães et al. (2015); and their resistance to 12 antibiotics [ampicillin (10 µg mL⁻¹, chloramphenicol (30 µg mL⁻¹), erythromycin (15 µg mL⁻¹), kanamycin (30 µg mL⁻¹), gentamicin (10 µg mL⁻¹), azithromycin (15 µg mL⁻¹), streptomycin (10 µg mL⁻¹), rifamycin (30 µg mL⁻¹), nalidixic acid (30 µg mL⁻¹), clarithromycin (15 µg mL⁻¹), amoxicillin (10 µg mL⁻¹), and vancomycin (30 µg mL⁻¹)] (Cecon™, Brazil) was evaluated by Oliveira-Longatti et al. (2014).

The ability of the two UFLA strains to assimilate eight nitrogen sources [glycine, L(-) cysteine, casein hydrolysate, L(-) asparagine, L(+) arginine, L(-) glutamic acid, L(-) methionine, and tryptophan] and 16 carbon source (D-fructose, citric acid, L-asparagine, L-arabinose, D-arabinose, glycerol, glycine, D-glucose, glutamine, L-glutamic acid, lactose, malic acid, maltose, mannitol, methionine, sodium lactate, and sucrose) was evaluated as well. Nitrogen and carbon assimilation analyses were performed in modified Medium 79 according to Costa et al. (2017). For further analysis, the UFLA03-164^T was grown in Medium 79 and transferred onto an API 20 NE (bioMérieux) strip following manufacturer's instructions. Cell optical density turbidity was adjusted to the 5.0 McFarland standard. The results of carbon assimilation and enzymatic reactions were evaluated after 7 days of incubation.

Results and discussion

Phylogeny of 16S rRNA and housekeeping genes

Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes showed that both the UFLA strains clustered very closely and in the same super clade of *B. elkanii* (Fig. 1). The UFLA strains showed a similarity greater than 99% among

themselves and all the species positioned in that super clade (Table S2). The species with greatest similarity were *Bradyrhizobium lablabi* CCBAU 23086^T (99.8%) and *Bradyrhizobium algeriense* RST89^T (99.8%), followed by 12 other *Bradyrhizobium* species (Table S2). Although *B. neotropicale* BR 10247^T (98.5%) and *B. centrolobii* BR 10245^T (98.1%) are in the same cluster, they showed a greater evolutionary distance compared with UFLA03-164^T, UFLA03-153, and all the *Bradyrhizobium* species belonging to the same cluster. Though this genetic marker is still used as preliminary information for prokaryotic organisms, it has low resolution at the species level (Glaeser and Kämpfer 2015). This is especially true for members of *Bradyrhizobium*, as the variability of 16S rRNA is generally low due to relatively high similarity of sequences and a high degree of conservation among species (Willems et al. 2001; Rivas et al. 2009; Ribeiro et al. 2015). For that reason, to differentiate highly related species and to obtain a more detailed phylogenetic position of an isolate at the species level, multilocus sequence analysis (MLSA) has been recommended as an alternative to ribosomal RNA genes (Vinuesa et al. 2005; Oren and Garrity 2014; Azevedo et al. 2015). This methodology consists of selecting various metabolic genes (housekeeping genes) to successfully differentiate rhizobial species (Berrada and Fikri-Benbrahim 2014).

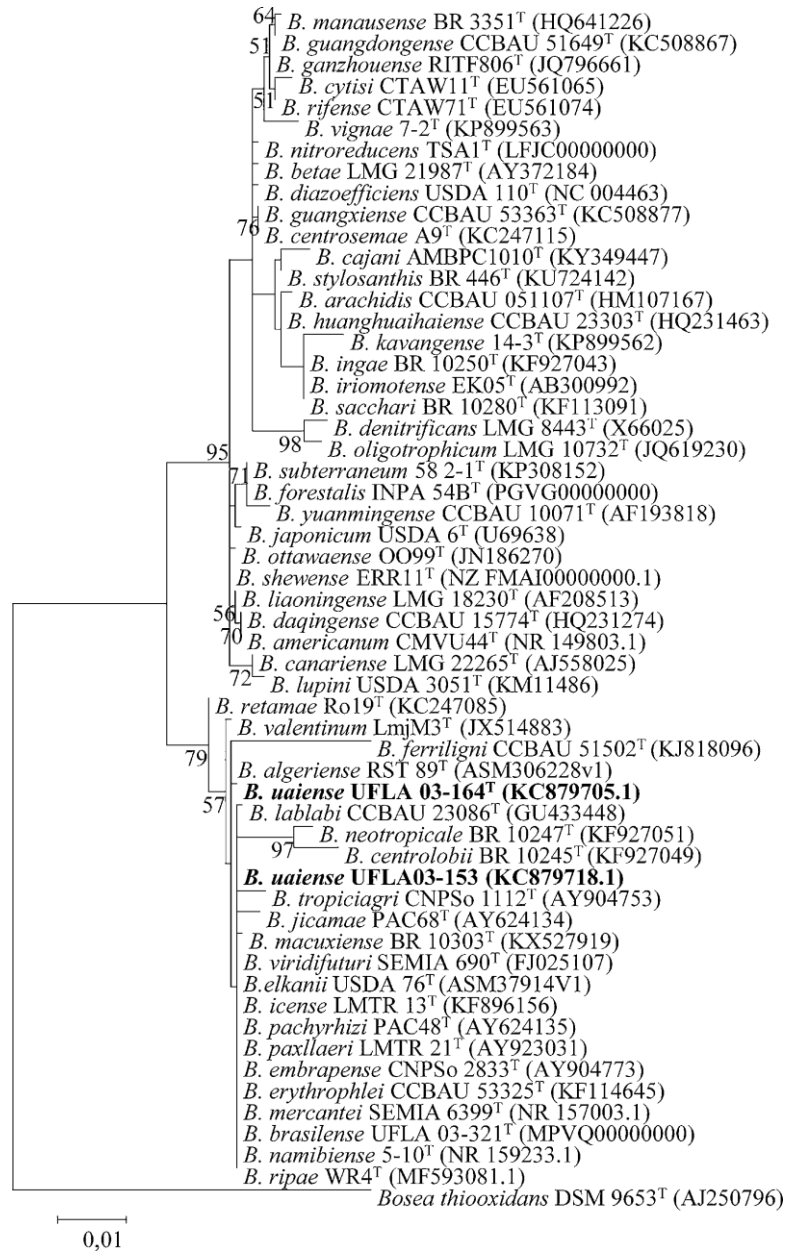


Fig. 1 Maximum likelihood phylogeny based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between the new species (UFLA03-164^T and UFLA03-153) and other members of the *Bradyrhizobium* genus. Bootstrap values higher than 50% are indicated at the node. Bar, 1 substitution per 100 nucleotide positions. *Bosea thiooxidans* DSM 9653^T was used as an outgroup

Concatenation of three housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, and *dnaK*) showed that the two UFLA strains formed a separate clade with high bootstrap support (100%) (Fig. 2) and had a sequence similarity of 98.7% between them (Table S2). Both UFLA03-164^T and UFLA03-153 were closely related to *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (96.2%), *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T (96.1%), and *B. mercantei* SEMIA 6399^T (95.8%). This result is consistent with analysis of 16S rRNA gene but with better phylogenetic resolution. All these three species showed 16S rRNA similarity values higher than 99%. A further analysis including six concatenated housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *glnII*, and *rpoB*) showed that the type strain UFLA03-164^T had a position separate from any other *Bradyrhizobium* species (Fig. S1). The type strain clustered with and was more closely related to *B. viridifuturi* SEMIA 690^T, *B. mercantei* SEMIA 6399^T, *B. pachyrhizi* PAC 48^T, *B. brasilense* UFLA03-321^T, and *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T, with similarities ranging from 96.3 to 95.3% (Table S2).

Average nucleotide identity (ANI) and G + C content

The ANI values between UFLA03-164^T and the closest species (Table 1) were all below 92%. The highest ANI observed was between the strain UFLA03-164^T and *B. tropiciagri* (91.5%). A widely adopted threshold (95–96%) was considered a cutoff to describe a prokaryotic species (Richter and Rosseló-Mora, 2009). The genomes of UFLA03-164^T and the closest known species are sufficiently distinct to consider this strain as belonging to a new species. The group comprising the five closest species included *B. tropiciagri* (91.5%), *B. viridifuturi* (91.2%), *B. embrapense* (91.1%), *B. mercantei* (91.1%), *B. brasilense* (91.0%), and *B. elkanii* (90.8%). They belong to one of the seven lineages found by Avon-tuur et al. (2019), indicating that *B. uaiense* also belongs to this lineage. All these species except *B. brasilense* also belong to superclade II, as reported by Ormeño-Orrillo and Martínez-Romero (2019). The G+C content in the DNA of UFLA03-164^T is 63.25%, which is within the range found in *Bradyrhizobium* (Kuykendall et al. 1992; Xu et al. 1995; Ramírez-Bahena et al. 2009; Chahboune et al. 2011).

Table 1 Average nucleotide identity (ANI) between whole genome sequences of *B. uaiense* strains and more related *Bradyrhizobium* species

Reference strains	UFLA03-164 ^T
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	91.5
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	91.2
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	91.1
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	91.1
<i>B. brasilense</i> UFLA03-321 ^T	91.0
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	90.8
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	90.7

Phenotypic characterization

Both UFLA strains grew in a wide range of pH and temperature, but they did not grow at 40 °C. Only UFLA03-153 is tolerant to a NaCl concentration up to 0.75% (Table S3). With respect to antibiotic resistance, both strains were resistant to 11 out of 12 antibiotics tested, the only exception being rifamycin (30 µg mL⁻¹), to which both strains were susceptible (Table S3). In relation to assimilation of 16 carbon sources, the strains only assimilated D-glucose differently, which was positive for UFLA03-153 and negative for UFLA03-164^T. The results of nitrogen assimilation were similar for the two strains.

Phylogeny of *nodC* and *nifH* genes

Generally, genes involved in nodulation and nitrogen fixation are evaluated when characterizing new species of nitrogen-fixing bacteria. For that reason, sequences of *nodC* and *nifH* of the two UFLA strains and type strains of *Bradyrhizobium* species available in GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) were compared through phylogenetic analyses. The analysis of *nodC* phylogeny showed that both UFLA strains clustered together, but with low bootstrap support (Fig. 3). They formed a cluster with *B. viridifuturi* SEMIA 690^T, similarity of 98.5%, and *B. embrapense* CNPSo 2833^T, similarity of 98.3%. Similar to these results, a recent study based on the phylogeny of the *nodC* gene showed that the two species mentioned, along with *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T, formed a separate cluster that constitutes a new symbiovar named tropici (Ramírez-

Bahena et al. 2016).

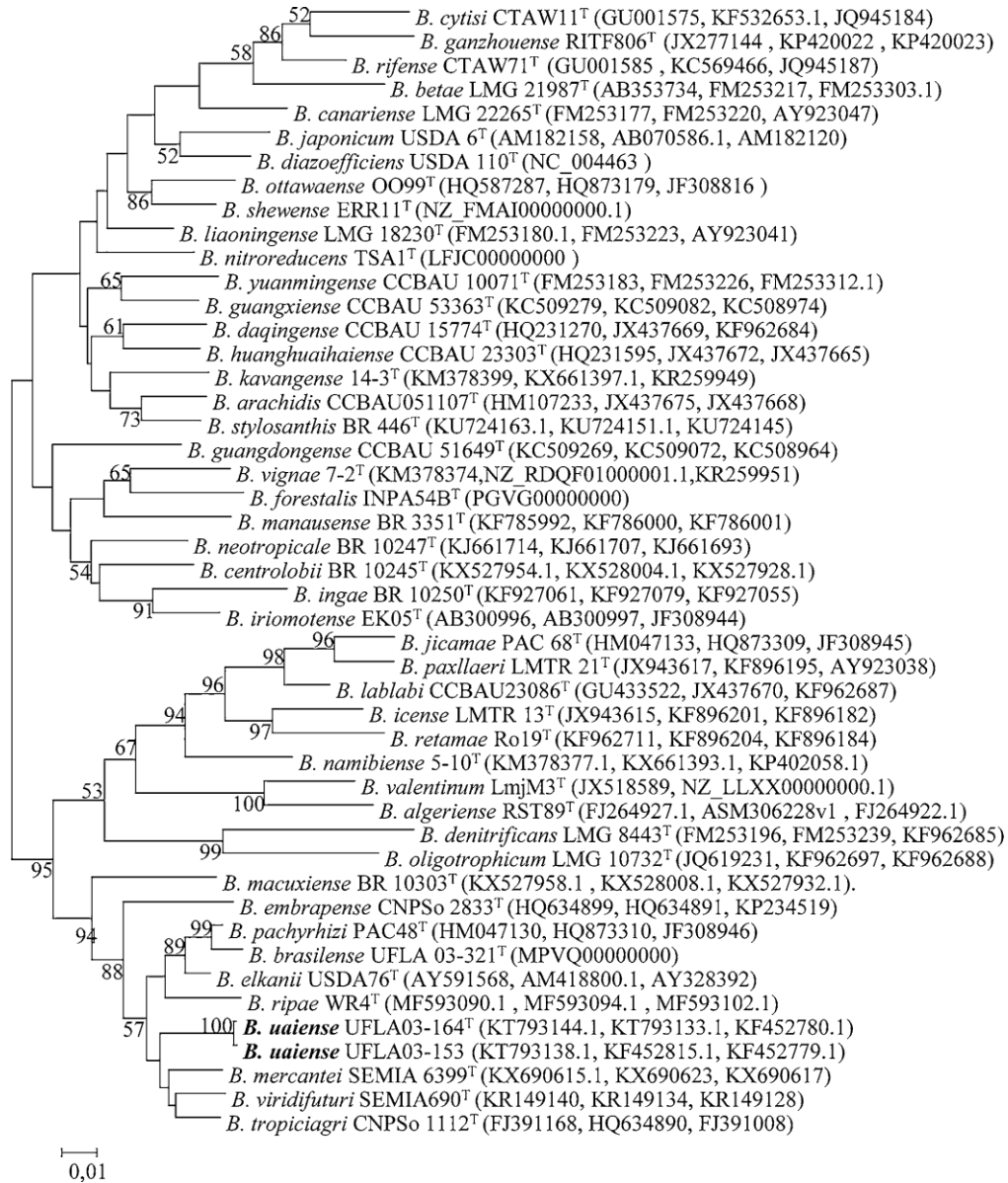


Fig. 2 Maximum likelihood phylogeny based on *recA*, *gyrB*, and *dnaK* gene sequences showing the relationship between strains of the new species *B. uaiense* (in bold) and other members of the genus *Bradyrhizobium*. Bar, 1 substitution per 100 nucleotide positions. Bootstrap values greater than 50% are indicated at nodes. Gene accession numbers for each strain are given in parentheses

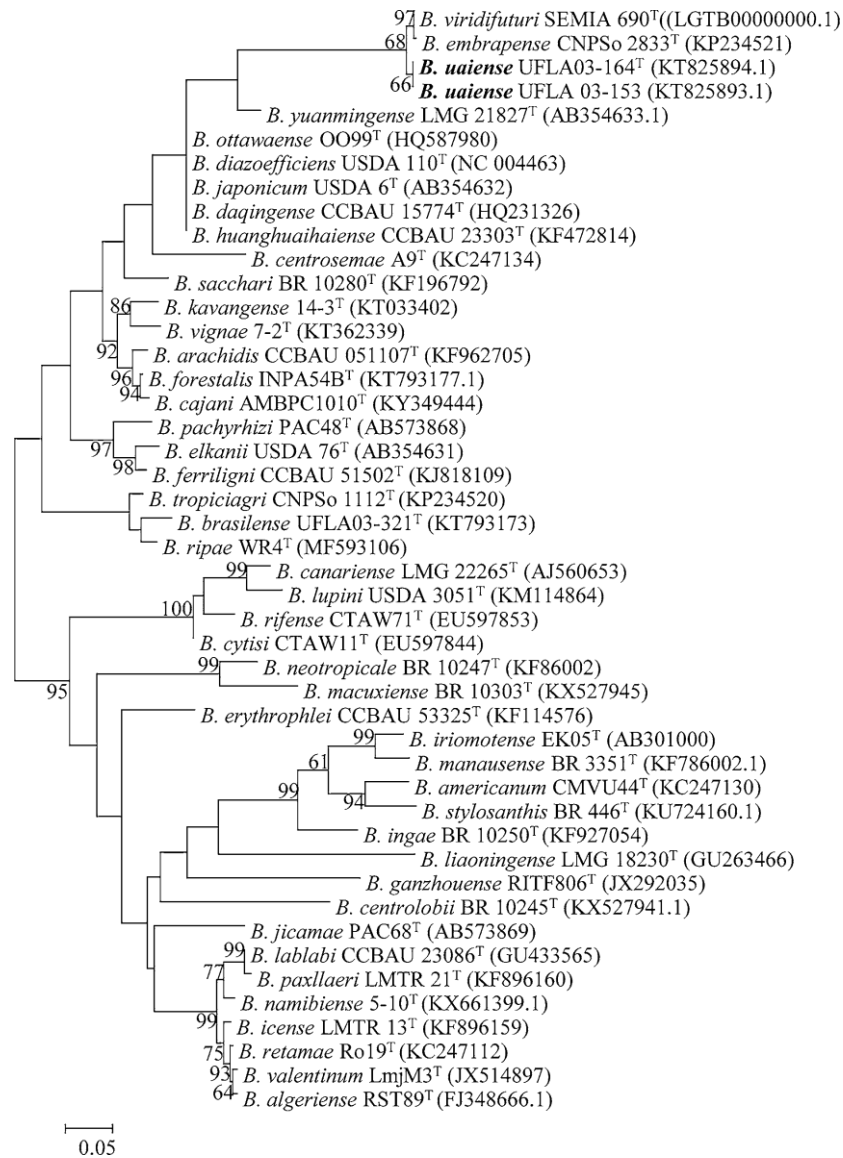


Fig. 3 Maximum likelihood phylogeny based on *nodC* gene showing the relationship between strains of the new species (shown in bold) and species of the *Bradyrhizobium* genus. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value (1000 subsets). Bar, 5 substitutions per 100 nucleotides. The phylogeny of the tree was built using partial deletion for gaps/missing data because the overlap of the *nodC* sequences among strains was variable

The *nifH* sequences of UFLA03-164^T and UFLA03-153 clustered in the same clade with *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T, *B. embrapense* CNPSo 2833^T, and *B. viridifuturi* SEMIA690^T, with a high bootstrap of 100% (Fig. S2). The two UFLA strains and *B. tropiciagri* showed a similarity of 100%. Slightly lower similarities were observed with *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (99.5%) and *B. embrapense* CNPSo 2833^T (99.5%). This result is congruent with the concatenated analyses of three and six housekeeping genes. Thus, it can be inferred that the evolutionary history of the *nifH* gene in these species is similar. A vertical transmission of this gene has likely occurred, clustering them and showing a monophyletic origin.

In nodulation tests, both strains showed the ability to nodulate two legume tree species, *Enterolobium contortisiliquum* (earpod tree) and *Anadenanthera colubrina* (red angico). Both UFLA strains were capable of nodulating *Vigna unguiculata* L. (cowpea) with good symbiotic efficiency. In addition, both strains were able to nodulate *Cajanus cajan* (pigeon pea), but no data are available on their efficiency on this plant. The two UFLA strains were able to nodulate *Phaseolus lunatus* L. (lima bean), but with low symbiotic efficiency. Finally, only UFLA03-153 was able to nodulate (*Glycine max*) (Table S4).

Description of *Bradyrhizobium uaiense* sp. nov.

Bradyrhizobium uaiense (u.ai.en'se. N.L. neut. adj. uaiense from “uai”, interjection commonly used in the state of Minas Gerais, Brazil). The origin of the interjection is believed to date from the times of the “Inconfidentes Mineiros”, patriots fighting for Brazilian independence from Portugal. To protect themselves from Portuguese authorities, they communicated through passwords. UAI was composed of the initials of *União, Amor e Independência* (‘union, love, and independence’).

Cells are Gram-negative rods, aerobic, and non-spore forming. Colonies are cream colored and have a diameter > 1 mm, and are cream colored in Medium 79 after 6 days of incubation at 28 °C. The two strains grow at temperatures ranging from 15 to 37 °C, with optimal growth at 28 °C. Strains grow in the presence of 0.5% NaCl. Both strains are resistant to ampicillin (10 µg mL⁻¹), chloramphenicol (30 µg mL⁻¹), erythromycin (15 µg mL⁻¹), kanamycin (30 µg mL⁻¹), gentamicin (10 µg mL⁻¹), azithromycin (15 µg mL⁻¹), streptomycin (10 µg mL⁻¹), nalidixic acid (30 µg mL⁻¹), clarithromycin (15 µg mL⁻¹), amoxicillin (10 µg mL⁻¹), and vancomycin (30 µg mL⁻¹). All strains are sensitive to rifamycin (30 µg mL⁻¹). They can assimilate D-arabinose

and mannitol and weakly assimilate L-asparagine, D-fructose, glycerol, glutamine, and lactose. They cannot assimilate citric acid, glycine, malic acid, maltose, methionine, sodium lactate, and sucrose. With respect to nitrogen sources, all strains use casein hydrolase and L (-) glutamic acid. They weakly use L (+) arginine. They do not use L (-) cysteine, glycine, L (-) methionine, and tryptophan. The type strain UFLA03-164^T, in the API test, had positive results for nitrate reduction, arginine dihydrolase, urease, and hydrolysis of esculin, but negative for gelatin hydrolysis and β -galactosidase.

The type strain UFLA03-164^T (LMG 31509^T) was isolated from *Vigna unguiculata* L. (cowpea) cultivated in soil samples from a bauxite mining area in the mountainous region of Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil. The DNA G+C content of the type strain UFLA03-164^T is 63.25 mol%. The Genbank/NCBI accession numbers of the genome, 16S rRNA, *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *nodC*, and *nifH* are VKHP00000000, KC879705.1, KT793144.1, KT793133.1, KF452780.1, KF452739.1, KT825894.1, and KT825888.1, respectively. The *glnII* and *rpoB* were extracted from the type strain UFLA03-164^T genome.

Acknowledgements We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (CAPES/PROEX AUXPE 593/2018), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Process: 304527/2016-5; Process: 431504/2016-4), and the Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (PACSS/PPGCS-2009-2012) for financial support and for granting scholarships. This research is associated with the Brazilian National Institute of Science and Technology (Soil Biodiversity/INCT-CNPq).

References

- Avontuur JR, Palmer M, Beukes CW, Chan WY, Coetzee MPA, Blom J, Stepkowski T, Kyrpides NC, Woyke T, Shapiro N, Whitman WB, Venter SN, Steenkamp ET (2019) Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Syst Appl Microbiol* 42:427–439
- Azevedo H, Lopes FM, Silla PR, Hungria M (2015) A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using Multilocus sequence analysis. *BMC Genom* 16(Suppl. 5): S10
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its application to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477
- Berrada H, Fikri-Benbrahim K (2014) Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *Br Microbiol Res J* 4(6):616–639
- Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar EJ (2011) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2922–2927
- Costa EM, Guimarães AA, Vicentin RP, Ribeiro PRA, Leão ACR, Balsanelli E, Lebbe L, Aerts M, Willems A, Moreira FMS (2017) *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. *Arch Microbiol* 199:1211–1221
- de Lajudie PM, Andrews M, Ardley J, Eardly B, Jumas-Bilak E, Kuzmanovic N, Lassalle F, Lindström K, Mhamdi R, Martínez-Romero E, Moulin L, Mousavi SA, Nesme X, Peix A, Putawska J, Steenkamp E, Stepkowski T, Tian CF, Vinuesa P, Wei G, Willems A, Zilli J, Young P (2019) Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 69:1852–1863
- Delamuta JR, Ribeiro RA, Araújo JL, Rouws LF, Zilli JÉ, Parma MM, Melo IS, Hungria M (2016) *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:3078–3087
- De Ley J (1968) DNA base composition and hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 6:63–90
- De Meyer SE, Van Hoorde K, Vekeman B, Braeckman T, Willems A (2011) Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 43:2384–2396
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
- Farias TP, Trochmann A, Soares BL, Moreira FMS (2016a) Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão state. *Acta Sci Agron* 38:387–395

- Farias TP, Soares BL, De Araújo ARA, Moreira FMS (2016b) Symbiotic efficiency of rhizobia strains with cowpea in southern Maranhão. *Rev Caatinga* 29:611–618
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376
- Florentino LA, Sousa PM, Silva JS, Silva KB, Moreira FMS (2010) Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. *Rev Bras Cien Solo* 34:1113–1123
- Fred EB, Waksman SA (1928) Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil. McGraw-Hill Book, New York
- Gaby JC, Buckley DH (2012) A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS ONE* 7: e 42149
- Glaeser SP, Kämpfer P (2015) Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol* 38:237–245
- Gouy M, Guindom S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221–224
- Guimarães AA, Florentino LA, Almeida KA, Lebbe L, Silva KB, Willems A, Moreira FMS (2015) High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. *Syst Appl Microbiol* 38:433–441
- Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *PNAS* 7:2567–2572
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) Mega 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol* 38:501–505
- Marçais G, Delcher AL, Phillippy AM, Coston R, Salzberg SL, Zimin A (2018) MUMmer 4: a fast versatile genome alignment system. *PLoS Comput Biol* 14:e 1005944
- Marra LM, de Oliveira SM, Soares CRFS, Moreira FMS (2011) Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Sci Agric (Piracicaba, Braz.)* 68:603–609
- Melloni R, Moreira FMS, Nóbrega RSA, Siqueira JO (2006) Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata*] e Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Rev Bras Cien Solo* 30:235–246
- Niemann S, Puehler A, Tichy HV, Simon R, Selbitshka W (1997) Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J Appl Microbiol* 82:477–484

- Oliveira-Longatti SM, Marra LM, Soares BL, Bomfeti CA, da Silva K, Ferreira PAA, Moreira FMS (2014) Bacteria isolated from soil of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World J Microbiol Biotechnol* 30:1239–1250
- Oren A, Garrity GM (2014) Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:43–56
- Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E (2019) A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium*. Genus *Front Microbiol* 10:1334
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells and metagenomes. *Genomes Res* 25:1043–1055
- Ramírez-Bahena MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Mateos PF, Martínez-Molina E, Willems A, Velázquez E (2009) *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov., and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1929–1934
- Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Chahboune R, Toro M, Velázquez E, Peix A (2016) *Bradyrhizobium centrosemae* (symbiovar *centrosemae*) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar *phaseolarum*) sp. nov., and a new symbiovar with *Centrosema* species native to America. *Syst Appl Microbiol* 39:378–383
- Ribeiro PRA, Santos JV, Costa EM, Lebbe L, Louzada MO, Guimarães AA, Assis ES, Willems A, Moreira FMS (2015) Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agr Ecosyst Environ* 212:85–93
- Richter M, Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19126–19131
- Rivas R, Martens M, Lajudie P, Willems A (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 32:101–110
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sarita S, Sharma PK, Priefer UB, Prell J (2005) Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 54:1–11
- Soares BL, Ferreira PAA, Oliveira-Longatti SM, Marra LM, Rufini M, Andrade MJB, Moreira FMS (2014) Cowpea symbiotic efficiency, pH, and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. *Sci Agric* 71:171–180
- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol* 9:678–687
- Vinuesa P, Silva C, Werner D, Martínez-Romero E (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol* 34:29–54

- Willems A, Coopman R, Gillis M (2001) Phylogenetic and DNA–DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:111–117
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 45:706–711
- Yao Y, Sui XH, Zhang XX, Wang ET, Chen WX (2015) *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov., and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1831–1837

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Archives of Microbiology

Supplementary material

***Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont**

Daniele Cabral Michel, Amanda Azarias Guimarães, Elaine Martins da Costa, Teotonio Soares de Carvalho, Eduardo Balsanelli, Anne Willians, Emanuel Maltempi de Souza, Fatima Maria de Souza Moreira*

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail address: fmoreira@ufla.br (F.M. de Souza Moreira).

Table S1. Genbank accession number of housekeeping genes and genomes evaluated in this study.

Strains	recA	gyrB	dnaK	atpD	glnII	rpoB
UFLA03-164 ^T	KT793144.1	KT793133.1	KF452780.1	KF452739.1	VKHP00000000	VKHP00000000
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	HM107233	KR149134	KR149128	NZ_LGTB00000000.1	KR149131	KU724169.1
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	AB353734	JX437675	JX437668	HM107217.1	HM107251	JX437682
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	FM253177	FM253217	FM253303.1	FM253129.1	AB353733	FM253260
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	GU001575	FM253220	AY923047	FM253135.1	AY386765	FM253263
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	HQ231270	KF532653.1	JQ945184	GU001613.1	GU001594	JN186288
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	KR149140	JX437669	KF962684	HQ231289.1	HQ231301	JX437676
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	FM253196	FM253239	KF962685	FM253153.1	HM047121	FM253282
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	AY591568	AM418800.1	AY328392	ASM37914V1	AY599117	AM295348
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	JX277144	KP420022	KP420023	JX277182.1	JX277110	-
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	HQ231595	JX437672	JX437665	HQ231682.1	HQ231639	LM994169
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	JX943615	KF896201	KF896182	KF896192.1	KF896175	NZ_CP016428.1
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	KF927061	KF927079	KF927055	KY753593.1	KF927067	KF927073
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	AB300996	AB300997	JF308944	LM994395.1	AB300995	HQ587646
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	AM182158	AB070586.1	AM182120	AM418753.1	HQ587875	AM295349
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	HM047133	HQ873309	JF308945	FJ428211.1	FJ428204	HQ587647
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	GU433522	JX437670	KF962687	GU433473.1	GU433498	JX437677
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	FM253180.1	FM253223	AY923041	AY386752.1	AY386775	FM253266
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	KF785992	KF786000	KF786001	NZ_LJYG00000000.1	KF785986	KF785998
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T	KJ661714	KJ661707	KJ661693	NZ_LSEF00000000.1	KJ661700	KF983829
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	JQ619231	KF962697	KF962688	JQ619232.1	JQ619233	KF962713
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	HQ587287	HQ873179	JF308816	HQ455212.1	HQ587750	HQ587518
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	HM047130	HQ873310	JF308946	FJ428208.1	FJ428201	HQ587648
<i>B. paxllaeri</i> LMTR_21 ^T	JX943617	KF896195	AY923038	KF896186.1	KF896169	KP308154
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	KF962711	KF896204	KF896184	KC247101.1	KC247108	KF962714
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	GU001585	KC569466	JQ945187	GU001617.1	GU001604	KC569468
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	FM253183	FM253226	FM253312.1	AY386760.1	AY386780	FM253269
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	HQ634899	HQ634891	KP234519	HQ634875.1	GQ160500	HQ634910
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	KC509269	KC509072	KC508964	KC508916.1	KC509023	KC509318
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	KC509279	KC509082	KC508974	KC508926.1	KC509033	KC509328

<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	KM378399	KX661397.1	KR259949	KX661392.1	KM378446	KM378311
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	JX518589	NZ_LLXX0000000.1	NZ_LLXX0000000.1	JX518561.2	JX518575	NZ_LLXX0000000.1
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	KM378374	NZ_RDQF01000001.1	KR259951	NZ_RDQF01000001.1	KM378443	KM378308
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	KM378397	-	KP308157	KX661391.1	KM378484	KM378349
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	KF114669	KF114717	-	-	KF114693	-
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	KJ818112	KJ818102	-	-	KJ818099	-
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463
<i>B. tropiciagri</i> CNPSO 1112 ^T	FJ391168	HQ634890	FJ391008	FJ390968.1	FJ391048	HQ634909
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	KX690615.1	KX690623	KX690617	NZ_MKFI01000001.1	KU724148	NZ_MKFI01000001.1
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000
<i>B. americanum</i> CMVU 44 ^T	KC247141.1	-	-	KC247125.1	KX012942.1	-
<i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T	KY349440.1	-	-	-	KY349442.1	-
<i>B. centrosemae</i> A9 ^T	KC247145.1	-	-	KC247129.1	KX012940.1	-
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	KU724163.1	KU724151.1	KU724145	NZ_LVEM00000000.1	KU724148.1	KU724166
<i>B. lupini</i> USDA 3051 ^T	KM114866.1	-	-	-	KM114862.1	NZ_AMQQ00000000.1
<i>B. shewense</i> ERR 11 ^T	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1
<i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T	KX065095.1	-	KX065103.1	KX065107.1	KX065099.1	-
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	KX527954.1	KX528004.1	KX527928.1	NZ_LUUB00000000.1	KX527991.1	KF983827.3
<i>B. brasiliense</i> UFLA 03-321 ^T	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	KX527958.1	KX528008.1	KX527932.1	NZ_LNCU01000024.1	KX527995.1	KX527969.1
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	KM378377.1	KX661393.1	KP402058.1	KX661387.1	KM378440.1	KM378306.1
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000
<i>B. ripae</i> WR4 ^T	MF593090.1	MF593094.1	MF593102.1	-	-	MF593098.1
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	FJ264927.1	ASM306228v1	FJ264922.1	ASM306228v1	FJ264924.1	ASM306228v1

Table S2 Similarity of 16S rRNA, housekeeping, and symbiotic genes within *Bradyrhizobium uaiense* and between the type strain UFLA 03-164^T and the type strains of *Bradyrhizobium* species

Strains	Similarity with <i>B. uaiense</i> UFLA03-164 ^T (%)										
	16s rRNA	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnaK</i>	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>	three genes*	six genes**	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
<i>B. uaiense</i> UFLA03-153	99.8	98.4	98.4	100	-	-	-	98.7	-	100	100
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	99.7	94.9	96.3	98.3	97.6	95.8	95.6	96.2	96.3	98.5	99.5
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	96.6	91.7	93.0	87.7	92.7	88.7	88.2	91.5	90.6	62.5	88.6
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	97.1	90.6	92.0	88.5	93.2	86.8	89.6	90.6	90.2	-	-
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	97.1	92.0	92.6	86.4	94.4	86.6	89.1	91.1	90.4	31.1	84.8
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	96.7	90.4	91.0	87.2	94.6	87.9	91.0	89.8	90.5	39.2	85.7
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	97.5	91.2	93.6	88.5	91.8	87.7	88.0	91.8	90.3	75.9	84.0
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	96.3	87.7	90.1	87.2	93.2	85.6	89.8	88.6	89.0	-	85.2
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	99.7	93.8	95.9	96.6	96.5	93.5	95.4	95.3	95.2	54.5	90.7
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	96.9	89.3	92.6	88.9	93.4	88.1	-	90.6	-	21.6	84.0
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	96.7	90.6	94.1	88.5	94.1	88.5	88.7	91.8	91.0	75.9	84.0
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	99.7	91.2	89.1	89.4	93.0	89.3	92.1	89.8	90.7	35.3	89.0
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	96.4	89.0	91.4	88.5	95.5	88.5	86.8	89.9	90.1	21.9	86.1
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	96.3	90.4	93.4	88.9	94.6	86.8	86.2	91.5	90.2	17.0	84.8
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	97.4	90.9	94.3	88.9	95.3	88.9	91.2	92.0	91.8	75.9	84.0
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	99.4	90.4	91.8	88.1	94.4	89.5	91.7	90.6	91.2	33.8	88.6
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	99.8	91.7	90.3	88.1	93.2	91.2	92.1	90.4	91.3	33.8	88.6
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	97.4	91.4	93.6	88.5	93.0	88.1	89.1	91.8	90.8	15.8	84.0
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	96.7	90.6	91.4	87.2	93.0	88.9	-	90.2	-	16.4	84.8
<i>B. neotropicale</i> BR 10247 ^T	98.5	90.1	92.8	87.2	96.0	88.1	87.3	90.6	90.5	32.5	86.5
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	96.7	89.3	89.5	87.7	93.7	85.6	90.3	88.9	89.3	-	-
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	97.4	90.9	92.4	88.1	92.7	89.1	89.1	91.0	90.6	75.6	84.0
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	99.7	94.4	95.9	96.6	96.7	94.7	95.4	95.5	95.5	55.3	90.7
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	99.7	90.4	91.0	88.9	92.7	90.0	92.1	90.5	91.1	33.1	88.6
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	99.4	91.2	88.5	87.7	91.6	88.5	91.4	89.3	89.9	35.1	89.9
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	96.8	90.9	92.8	88.1	93.4	87.9	90.5	91.1	90.8	34.9	85.2
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	97.0	91.4	93.0	88.1	95.5	89.3	88.0	91.5	91.1	79.1	86.5
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	99.7	93.6	95.9	94.0	96.7	95.2	94.4	94.6	95.0	98.3	99.5
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	96.8	90.4	93.6	-	92.7	87.0	89.8	91.6	90.3	-	-
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	97.1	91.2	93.2	-	92.7	88.5	88.5	91.4	90.5	-	-
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	96.6	91.2	93.2	87.7	95.1	88.5	89.6	91.4	91.1	61.4	-
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	99.6	92.5	88.1	87.2	92.5	86.2	91.0	89.5	89.6	34.6	89.4
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	96.8	90.9	92.8	88.5	94.4	88.7	89.1	91.3	90.9	61.2	-
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	97.3	90.9	-	90.2	94.8	88.7	87.8	-	-	-	-
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	99.7	92.2	92.8	-	-	93.1	94.9	-	-	39.1	89.9
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	97.8	95.4	93.7	-	-	94.3	-	-	-	55.8	89.9
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	97.2	89.8	94.1	87.2	94.1	89.1	89.6	91.2	91.0	76.0	84.0
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	99.0	94.4	96.5	98.3	96.0	93.1	95.1	96.1	95.3	50.2	100
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	99.7	94.9	95.5	98.3	95.8	96.4	94.0	95.8	95.6	-	84.0
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	97.3	90.9	92.0	87.2	94.1	87.7	88.0	90.6	90.2	63.0	86.9
<i>B. americanum</i> CMVU 44 ^T	97.5	90.4	-	-	92.3	88.1	-	-	-	16.5	83.6
<i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T	97.0	91.2	-	-	-	88.1	-	-	-	62.3	-
<i>B. centrosemae</i> A9 ^T	97.1	90.4	-	-	93.4	89.1	-	-	-	62.8	84.8
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	96.7	92.5	93.6	89.4	93.9	89.3	87.8	92.3	91.2	15.7	82.7
<i>B. lupini</i> USDA 3051 ^T	97.3	92.2	-	-	94.8	86.4	72.1	-	-	29.9	-
<i>B. shewense</i> ERR 11 ^T	97.5	91.7	93.6	87.7	92.7	88.7	88.0	91.7	90.6	-	-

<i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T	96.4	89.8	-	88.9	-	89.3	-	-	-	64.9	-
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	98.1	90.1	92.4	88.5	94.4	88.9	88.5	90.8	90.6	24.8	86.1
<i>B. brasiliense</i> UFLA 03-321 ^T	99.7	93.3	95.7	96.6	95.8	95.6	95.4	95.0	95.3	47.2	-
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	99.6	92.2	93.6	92.7	96.5	93.7	95.1	92.9	94.1	28.2	84.8
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	99.7	90.9	91.6	89.8	93.4	88.5	90.1	91.0	90.8	34.8	-
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	97.1	92.2	94.1	88.1	93.4	88.1	88.2	92.3	90.9	-	-
<i>B. ripae</i> WR4 ^T	99.7	94.1	95.3	98.3	-	-	95.1	95.5	-	48.7	-
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	99.8	92.0	87.4	88.9	94.4	88.9	91.4	89.3	90.5	34.6	89.4

*Concatenation of the genes *recA*, *gyrB*, and *dnaK*; ** Concatenation of the genes *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *glnII*, and *rpoB*.

Table S3. Main phenotypic features of the *B. uaiense* strains.

	UFLA03-164 ^T	UFLA03-153
Characteristics of growth		
15°C to 37°C	+	+
pH 4 to 10	+	+
0.75 %NaCl	-	+
Carbon source assimilation		
L-arabinose	+	w
D-fructose	W	w
Glycerol	W	w
D-glucose	-	w
Lactose	W	w
Maltose	-	-
Mannitol	+	+
Sucrose	-	-
Enzymatic activity		
Nitrate reduction	+	nd
Urea (urease)	+	nd
Nitrogen source assimilation		
Casein hydrolysate	+	+
L (-) Cysteine	-	-
Glycine	-	-
L (-) Glutamic acid	+	+
Resistance to antibiotics ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
Erythromycin (15)	R	R
Streptomycin (10)	R	R
Kanamycin (30)	R	R
Chloramphenicol (30)	R	R
Gentamicin (10)	R	R
Rifamycin (30)	S	S

*%NaCl according to Guimarães et al. (2015) and antibiotic test according to Oliveira-Longatti et al. (2014). + growth, - no growth, w weakly positive, nd not determined. For antibiotics, R – resistant, S- susceptible.

Oliveira-Longatti SM, Marra LM, Soares BL, Bomfeti CA, da Silva K, Ferreira PAA, Moreira FMS (2014)

Bacteria isolated from soil of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. World J Microbiol Biotechnol 30:1239-1250

Table S4. Ability of *B. uaiense* strains UFLA 03-164^T and UFLA 03-153 to nodulate legume species

Legume species	Nodulation	Effective nodulation	Source and reference
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	+	+	Santos et al., unpublished data
<i>Anadenanthera colubrina</i>	+	+	Santos et al., unpublished data
<i>Cajanus cajan</i>	+	ND	This work
<i>Glycine max</i> *	-/+	ND	This work
<i>Phaseolus lunatus</i> L.	+	-	Costa et al. 2017
<i>Vigna unguiculata</i> L.	+	+	Soares et al. 2014; Farias et al. 2016a,b; Oliveira-Longati et al. 2014, unpublished data

ND: not determined.

* Only the UFLA 03-153 strain was able to nodulate *Glycine max*.

Costa EM, Ribeiro PRA, de Lima W, Farias TP, Moreira FMS (2017b) Lima bean nodulates efficiently with *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume species. *Symbiosis* 73: 125-133

Farias TP, Trochmann A, Soares BL, Moreira FMS (2016a) Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão state *Acta Sci., Agron.* 38:387-395

Farias TP, Soares BL, De Araújo ARA, Moreira FMS (2016b) Symbiotic efficiency of rhizobia strains with cowpea in southern Maranhão *Rev. Caatinga* 29:611-618

Soares BL, Ferreira PAA, Oliveira-Longatti SM, Marra LM, Rufini M, Andrade MJB, Moreira FMS (2014) Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. *Sci. Agric.* 71:171–180

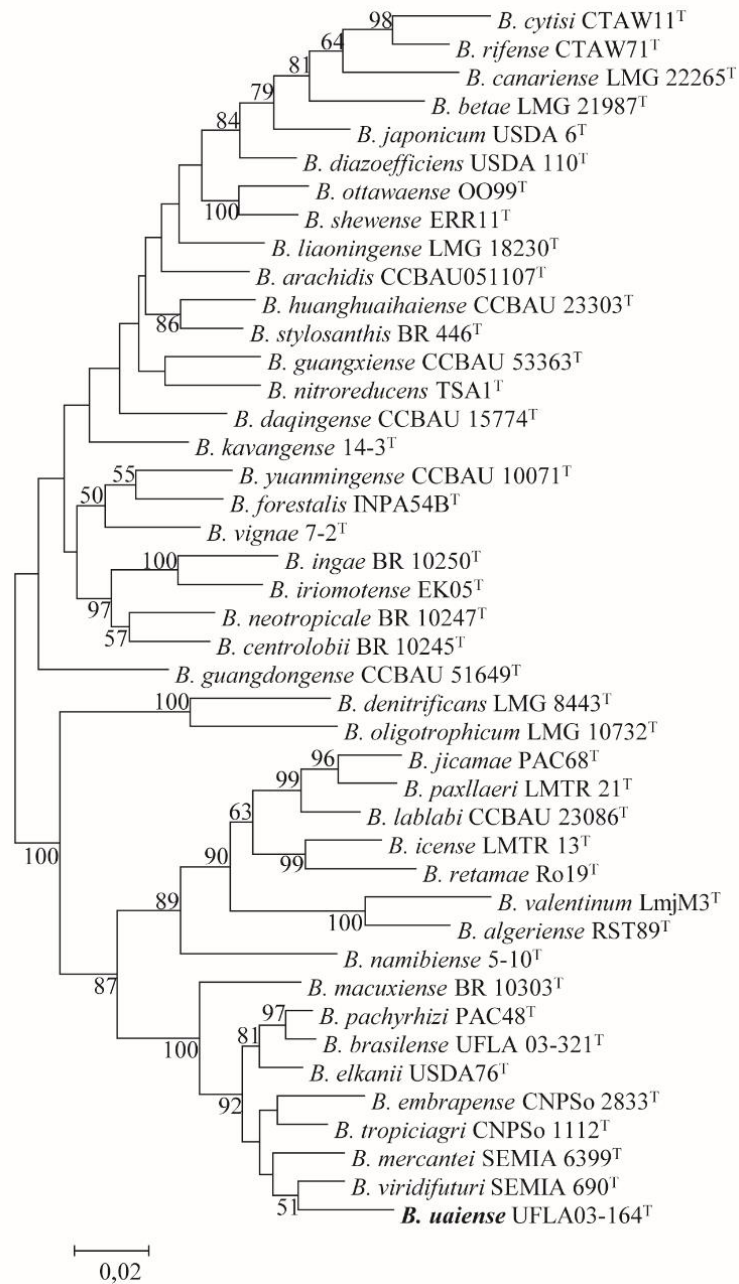


Fig. S1 Maximum likelihood phylogeny based on concatenated *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD*, *glnII*, and *rpoB* gene sequences showing the relationship between the type strain UFLA 03-164^T (shown in bold) and the other type strains of the *Bradyrhizobium* species. Bootstrap values (> 50%) are indicated at nodes. Bar 2, substitutions per 100 nucleotide positions. NCBI accession numbers for each strain are listed in Table S1.

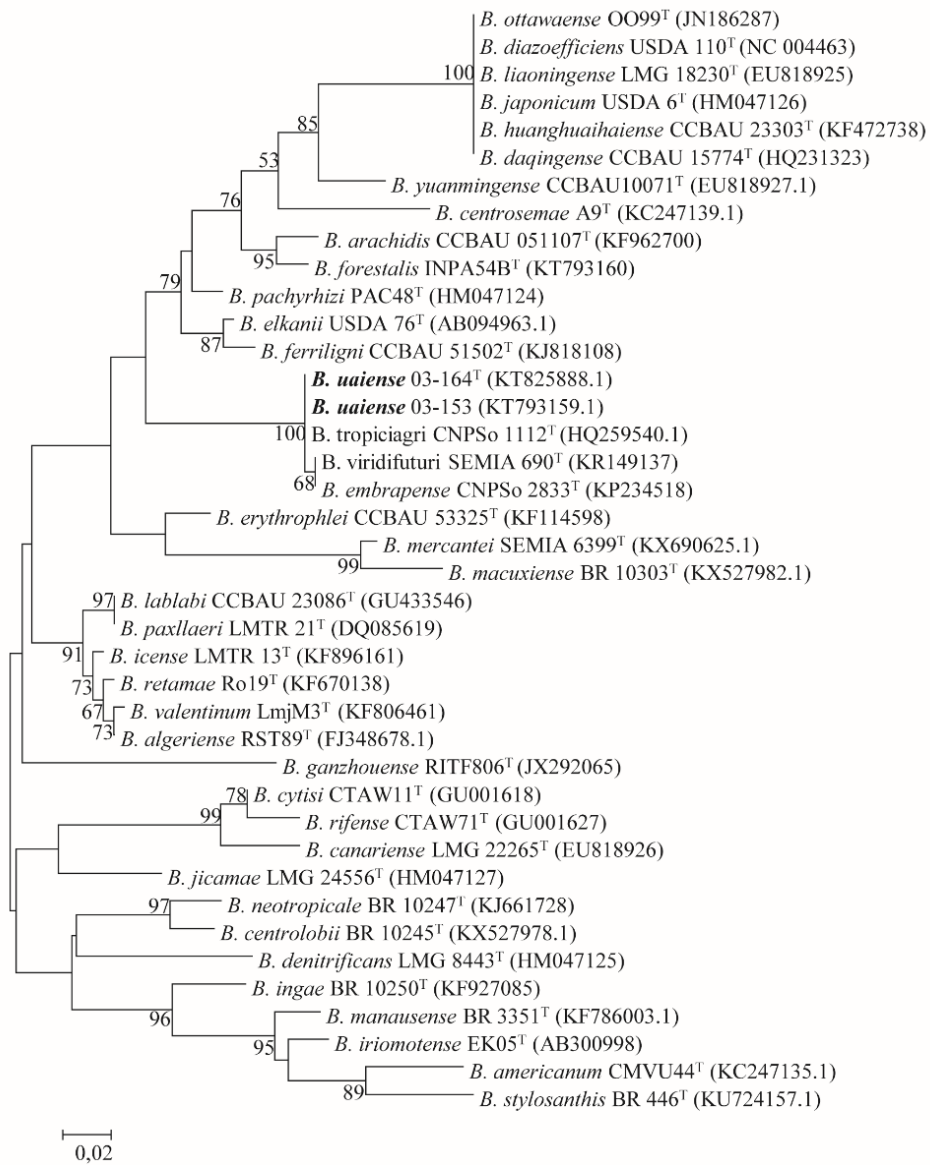


Fig. S2 Maximum likelihood phylogeny based on *nifH* gene sequences showing the relationship between strains of the new species (shown in bold) and other members of the genus *Bradyrhizobium*. Bootstrap values greater than 50% are indicated at nodes. Bar, 2 substitutions per 100 nucleotide position.

ARTIGO 2 - *Bradyrhizobium campsiandrae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterial strain isolated from a native leguminous tree from the Amazon adapted to flooded conditions

Artigo publicado na revista Archives of Microbiology

***Bradyrhizobium campsiandrae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterial strain isolated from a native leguminous tree from the Amazon adapted to flooded conditions**

Daniele Cabral Michel¹ · Elaine Martins da Costa² · Amanda Azarias Guimarães¹ · Teotonio Soares de Carvalho¹ · Polyane Santos de Castro Caputo¹ · Anne Willems³ · Fatima Maria de Souza Moreira¹

Received: 20 May 2020 / Revised: 23 July 2020 / Accepted: 13 August 2020 / Published online: 28 August 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The nitrogen-fixing bacterial strain UFLA 01-1174^T was isolated from nodules of *Campsiandra laurilifolia* Benth. originating from the Amazon region, Brazil. Its taxonomic position was defined using a polyphasic approach. Analysis of the 16S rRNA gene placed the strain in the *Bradyrhizobium* genus, the closest species being *B. guangdongense* CCBAU 51649^T and *B. guangzhouense* CCBAU 51670^T, both with 99.8% similarity. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *recA*, *gyrB*, *glnII*, *rpoB*, *atpD*, and *dnaK* indicated that UFLA 01-1174^T is a new species, most closely related to *B. stylosanthis* BR 446^T (94.4%) and *B. manausense* BR 3351^T (93.7%). Average nucleotide identity (ANI) differentiated UFLA 01-1174^T from the closest species with values lower than 90%. The G + C content in the DNA of UFLA 01-1174^T is 63.6 mol%. Based on this data, we conclude that the strain represents a new species. The name proposed is *Bradyrhizobium campsiandrae*, with UFLA01-1174^T (= INPA 394B^T= LMG 10099^T) as type strain.

Keywords Nitrogen fixation · Leguminous tree · *Bradyrhizobium* · Taxonomy

Communicated by Erko Stackebrandt.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00203-020-02022-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Fatima Maria de Souza Moreirafmoreira@ufla.br

¹ Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos Do Solo, Departamento de Ciência Do Solo, Universidade Federal de Lavras, Campus UFLA, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brazil

² Universidade Federal Do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Piauí 64900-000, Brazil

³ Laboratory of Microbiology, Department of Biochemistry and Microbiology, Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Ghent, Belgium

Introduction

Biological nitrogen fixation is essential for ecosystem functioning. This process, mediated by some prokaryote species, is responsible for converting atmospheric N₂ into plant-assimilable N. The rhizobial group, composed of bacteria that establish a symbiotic relationship with legume species, are recognized as efficient biological nitrogen fixers. The *Bradyrhizobium* genus, belonging to this group, is known to be a predominant symbiont of most nodulating legumes and can interact with a large group of legume clades (Moreira et al. 1993; Parker 2015). *Bradyrhizobium* species can establish symbiosis and fix N₂ with early and later emerging legume clades in subfamilies, such as Papilionoideae and Caesalpinioideae of the Leguminosae family (Rivas et al. 2009a, b; Beuker et al. 2016; Sprent et al. 2017).

Since the early 1980s, several studies surveying nodulating species in tropical legumes in Brazil have been intensified, showing that several tropical leguminous tree species are able to establish symbiotic relationships with rhizobial (Moreira et al. 1992; Faria et al. 1989; Sprent and Parson 2000). In Brazil, there are several *Bradyrhizobium* strains that can establish efficient symbiosis with diverse legume species. Consequently, some of them have already been officially approved as inoculants for legumes (MAPA—Brazilian Ministry of Agriculture Normative Instruction 2011).

Campsiandra laurilifolia Benth. is a leguminous tree species that is able to nodulate (Moreira et al. 1992; Sprent and Parsons 2000); it is native to Venezuela (Rengifo et al. 2005; Herrera et al. 2008), Peru (Macbride 1943), Colombia (Ulibarri 2008; Castellanos and Lewis 2012), and Brazil (Stergios 1996). In Brazilian territory, it can be found in flooded areas (igapós) and on the banks of igarapes and rivers in the Brazilian states of Amapá, Pará, and Amazonas (Moreira et al. 1992). In Brazil, it is recommended for recovery of floodplain forests (Vieira et al. 2017) and is used for construction and carpentry (Corrêa 1926).

Previous studies identified strains isolated from *Campsiandra laurilifolia* Benth. nodules as belonging to the *Bradyrhizobium* genus (Moreira et al. 1993). Further analysis of housekeeping genes showed that *Campsiandra laurilifolia* Benth. microsymbionts could be a new *Bradyrhizobium* species. Therefore, we performed studies to meet minimal standards for adequate description of the *Campsiandra* microsymbiont as a new *Bradyrhizobium* species, as recommended by de Lajudie et al. (2019).

Materials and methods

Origin of the strain

Owing to the difficulty of obtaining nodules from this leguminous species under flooded conditions, nodulation of *Campsiandra laurifolia* Benth. was induced by native rhizobia of a forest soil (Ultisol) used as a substrate for cultivation of this species under nursery conditions (Moreira et al. 1997). UFLA 01-1174^T was isolated from one of the nodules collected from this legume species growing in the substrate. Another strain (UFLA 01-1175) was isolated from another substrate (sand with nutrient solution); however, it was identified as a clone of UFLA 01-1174^T. Isolation and characterization were performed in medium 79 (Fred and Waksman 1928). Because the strains are clones, genome sequencing was performed only on UFLA 01-1174^T. These strains are deposited in the Sector of Soil Biology, Microbiology and Biological Processes of the Universidade Federal de Lavras, Brazil and in the culture collection (BCCM/LMG) of Ghent University, Belgium (UFLA 01-1174^T = INPA 394B^T = LMG 10099; UFLA 01-1175 = INPA 384B = LMG 10098).

Phylogenetic characterization

DNA was extracted from UFLA 01-1174^T and UFLA 01-1175 through the alkaline lysis method (Niemann et al. 1997). The 16S rRNA gene and six housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, *glnII*, *rpoB*, *atpD*, and *dnaK*) were evaluated for genetic characterization. The 16S rRNA sequence (1245 bp) and partial sequences of the *recA* (375 bp), *gyrB* (525 bp), *atpD* (429 bp), and *dnaK* (221 bp) genes of UFLA 01-1174^T and UFLA 01-1175 were amplified using the same primers and PCR cycles as Ribeiro et al. (2015). The sequences of the *glnII* (480 bp) and *rpoB* (459 bp) genes were obtained from the genome of the type strain UFLA 01-1174^T, with accession number JAANIH000000000 and from UFLA 01-1175 with accession number JAATTO000000000. To more accurately describe the rhizobial species, a multilocus sequence analysis (MLSA) was performed. Sequences of *recA*, *gyrB*, *glnII*, *rpoB*, *atpD*, and *dnaK* of the UFLA 01-1174^T type strain and UFLA 01-1175 were concatenated and compared with all type strains of *Bradyrhizobium* species available in the NCBI. The sequences of each gene were aligned using Muscle (Edgar 2004). Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 7.0 software package (Kumar et al. 2016) by the neighbor-joining (NJ) (Saitou and Nei 1987)

and maximum likelihood (ML) (Felsenstein 1981) statistical methods, using the Tamura 3 parameter method (Tamura 1992) with bootstrap values based on the 1000 replications to determine the strength of each topology. In addition to the housekeeping and 16S rRNA genes, the genes related to the symbiotic relation between plants and rhizobia, *nodC* (270 bp) and *nifH* (201 bp), were obtained from the UFLA 01-1174^T and UFLA 01-1175 genomes. The phylogenetic tree of each gene was constructed.

For the construction of phylogeny, the sequences of 16S rRNA and the housekeeping genes of all *Bradyrhizobium* species were obtained from Genbank (NCBI). For some *Bradyrhizobium* species, sequences of specific genes were extracted from their genomes. The genes and genome accession number of each strain are listed in Table S1.

Genomic comparison between the UFLA01-1174^T and UFLA01-1175

The analyses using all housekeeping genes evaluated in this study showed that the UFLA 01-1174^T and UFLA 01-1175 strains had 100% similarity. From these results, the genomes of both INPA strains were compared using the progressive MAUVE software (Darling et al. 2010). The results obtained showed that UFLA 01-1174^T and UFLA 01-1175 are clones. The assembled genomes of both UFLA 01-1174^T (JAANIH000000000) and UFLA 01-1175 (JAATTO000000000) have been deposited in the NCBI (National Center for Biotechnology Information). Also, the raw genome sequence of UFLA 01-1175 (PRJNA612854) has been deposited as a Sequence Read Archive (SRA) in the NCBI database. In view of this result, the description of the proposed new species was carried out using only UFLA 01-1174^T type strain.

Average nucleotide identity and G+C content

Recommended as an alternative to DNA–DNA hybridization methods, average nucleotide identity (ANI) is a robust tool to identify relatedness among strains (Konstantinidis and Tiedje 2005) as it is able to efficiently determine species boundaries and has higher resolution of identification (Richter and Rosselló-Móra 2009; Ciufu et al. 2018).

For ANI comparisons, the genome sequence of UFLA 01-1174^T was obtained after its growth in liquid medium 79. Subsequently, DNA from 10⁹ bacterial cells was purified using the phenol–chloroform extraction

protocol. The Nextera XT kit (Illumina) was used to prepare the library. The DNA library was constructed from 1 ng of total DNA for Illumina sequencing.

ANI values were obtained through pairwise comparisons between UFLA 01-1174^T (JAANIH000000000) with type strains of the most closely related (as indicated by the phylogenetic tree with six housekeeping genes) species of *Bradyrhizobium*, including *B. stylosanthis* BR 446^T, *B. manausense* BR 3351^T, and *B. huanghuaihaiense* CCBAU23303^T. The ANI was estimated using the genome alignment system MUMmer 4 (Marçais et al. 2018).

The G+C content of UFLA 01-1174^T was determined based on the draft genome obtained in this study.

Phenotypic characterization

For phenotypic characterization, the UFLA 01-1174^T strain was grown in medium 79 at different NaCl concentrations (w/v) (0.50, 0.75, and 1%). In addition, its susceptibility to antibiotics was also determined for cefuroxime (30 µg mL⁻¹), ampicillin (10 µg mL⁻¹), ciprofloxacin (5 µg mL⁻¹), doxycycline (30 µg mL⁻¹), chloramphenicol (30 µg mL⁻¹), erythromycin (15 µg mL⁻¹), gentamicin (10 µg mL⁻¹), kanamycin (30 µg mL⁻¹), and neomycin (30 µg mL⁻¹). The growth of the type strain in several temperatures (15, 20, 28, 34, 37, and 40 °C) and pH levels (4.0, 5.5, 6.8, 8.0, 9.0, and 10) was determined following the method described by Florentino et al. (2010). The ability of UFLA 01-1174^T to assimilate eight nitrogen sources (*L*-asparagine, *L*-arginine, casein hydrolysate, *L*-cysteine, glycine, *L*-glutamic acid, tryptophan, and *L*-methionine) and seventeen carbon sources (*L*-arabinose, *D*-arabinose, *L*-asparagine, citric acid, glycerol, *D*-fructose, glycine, *D*-glucose, glutamine, *L*-glutamic acid, malic acid, lactose, maltose, mannitol, methionine, sodium lactate, and sucrose) was also evaluated. For nitrogen and carbon source analysis, the UFLA 01-1174^T strain was grown in modified medium 79, as described in Costa et al. (2017). The main phenotypic characteristics of UFLA 01-1174^T are listed in Table S3.

Results and discussion

Phylogenetic characterization

The results of phylogenetic characterization of 16S rRNA were similar using the NJ (data not shown) and ML methods (Fig. 1). The phylogeny of the 16S rRNA gene indicated a similarity of 99% or more between the UFLA 01-1174^T strain and sixteen other strains from the *Bradyrhizobium* genus (Table S2). Based on this gene, the species closest to UFLA 01-1174^T were *B. guangdongense* CCBAU 51649^T (99.8%), *B. guangzhouense* CCBAU 51670^T (99.8%), *B. ganzhouense* RITF806^T (99.7%), and *B. manausense* BR 3351^T (99.7%). The UFLA 01-1174^T strain is in the *B. japonicum* USDA 6^T supergroup. This result is quite interesting, since previous studies have shown that *Bradyrhizobium* species isolated from legumes of tropical and subtropical regions predominantly belong to the *B. elkanii* supergroup (Durán et al. 2013; Avontuur et al. 2019). However, some researchers have described species from tropical regions that also belong to the *B. japonicum* supergroup (Silva et al. 2014; Costa et al. 2018). Thus, the phylogenetic position of *Bradyrhizobium* is not strictly related to the region from which these organisms were isolated.

Sequencing of the 16S rRNA gene is still used as preliminary information in taxonomic studies, and analysis of this gene allows relatedness between microorganisms to be measured above the species level. However, at the species level, high sequence similarity is obtained due to its high conservation, particularly in the *Bradyrhizobium* genus (Willems et al. 2001). Therefore, the taxonomic information obtained from the 16S rRNA sequences is limited (Rivas et al. 2009a, b). Thus, to elucidate more precisely these *Bradyrhizobium* species, the MLSA of conserved housekeeping genes was used. This technique, based on the concatenation of housekeeping genes, yields higher phylogenetic resolution, allowing classification of prokaryotes at species levels. Based on the MLSA of six housekeeping genes performed by the NJ (data not shown) and ML statistical methods, which showed similar results, the UFLA 01-1174^T was placed separate from all *Bradyrhizobium* species in the phylogenetic tree (Fig. 2). In addition, the species closest to UFLA 01-1174^T was *B. stylosanthis* BR 446^T (94.4%), followed by *B. manausense* BR 3351^T (93.7%), and *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T (93.6%). Although this result is considerably different from 16S rRNA gene phylogeny, it is more accurate, since 16S rRNA gene phylogeny has poorer phylogenetic resolution at the species level. In addition, it can be inferred from the phylogenetic tree based on the six concatenated housekeeping genes that UFLA 01-1174^T is a new species. This was corroborated by the ANI values comparing UFLA 01-1174^T and the closest species found in

concatenation analysis. Based on the results obtained in *nodC* phylogeny, it can be inferred that the UFLA 01-1174^T type strain is separate from the other *Bradyrhizobium* species in the phylogenetic tree (Fig. 3). Moreover, showed nine closest *Bradyrhizobium* species with similarity values of 84.7% (Table S2). The nodulation ability of UFLA 01-1174^T was confirmed when inoculated on *Macroptilium atropurpureum* under axenic conditions. However, it was not able to nodulate *Glycine max*, *Vigna unguiculata* L., and *Cajanus cajans*.

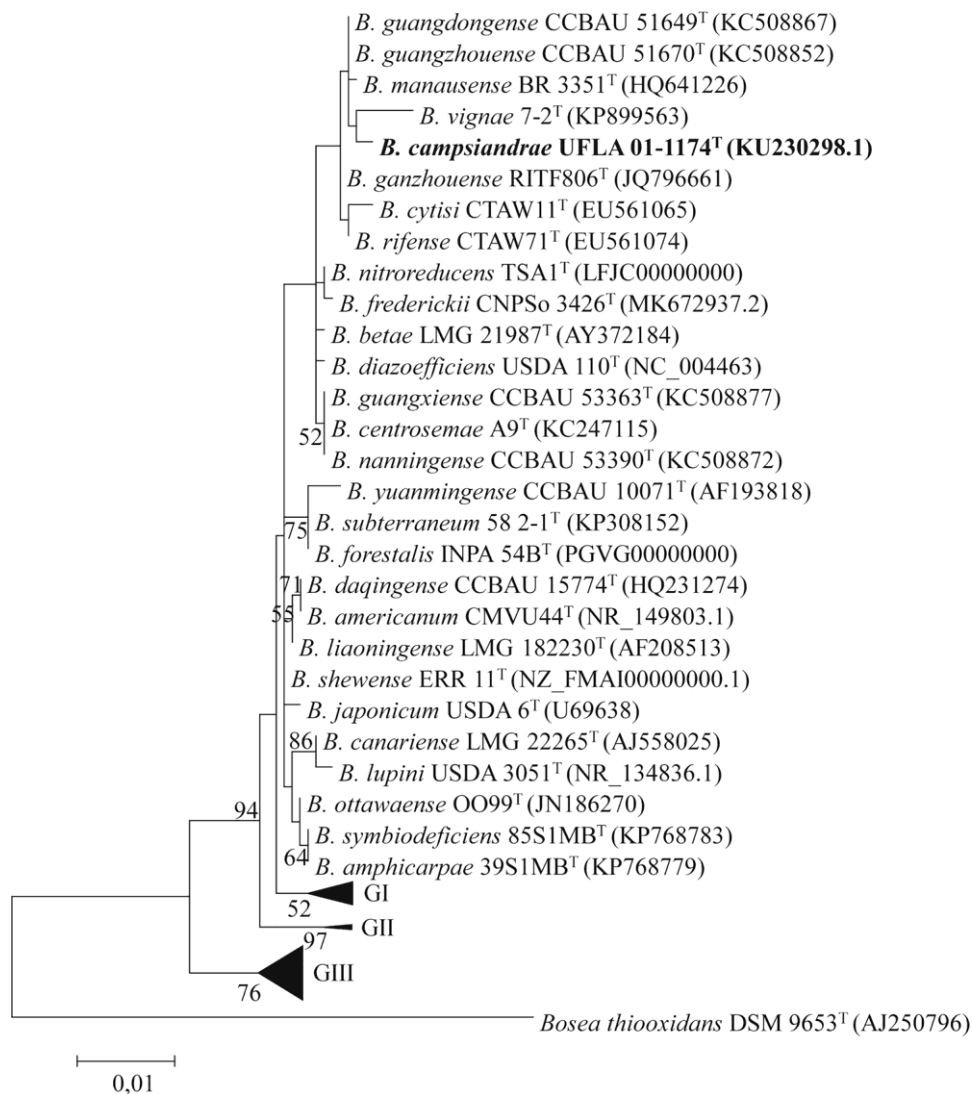


Fig. 1 Maximum likelihood phylogeny based on the 16S rRNA gene sequences (1245 bp) showing the relationship between the *B. campsiandrae* strain (shown in bold) and type strains of the *Bradyrhizobium* species. Bootstrap values greater than 50% are indicated at nodes. Bar, 1 substitution per 100 nucleotide positions. The 16S rRNA sequence of *Bosea thiooxidans* DSM9653^T was used as outgroup. The gene accession numbers of *Bradyrhizobium* species are given in parentheses. GI, GII and GIII are compressed groups of *Bradyrhizobium* species (type strains) fully listed in Table S4

Phylogenetic analysis of the *nifH* gene placed UFLA 01-1174^T separate from all *Bradyrhizobium* species (Fig S1). The UFLA 01-1174^T strain had similarity values equal to 97.9% with the seventeen closest species (Table S2). The species closest to UFLA 01-1174^T in *nifH* gene phylogeny were not the same as observed in the 16S rRNA and housekeeping gene trees, which is probably due to the horizontal gene transfer that commonly occurs in the evolutionary history of this symbiotic gene (Kaneko et al. 2002; Remigi et al. 2016; Andrews et al. 2018).

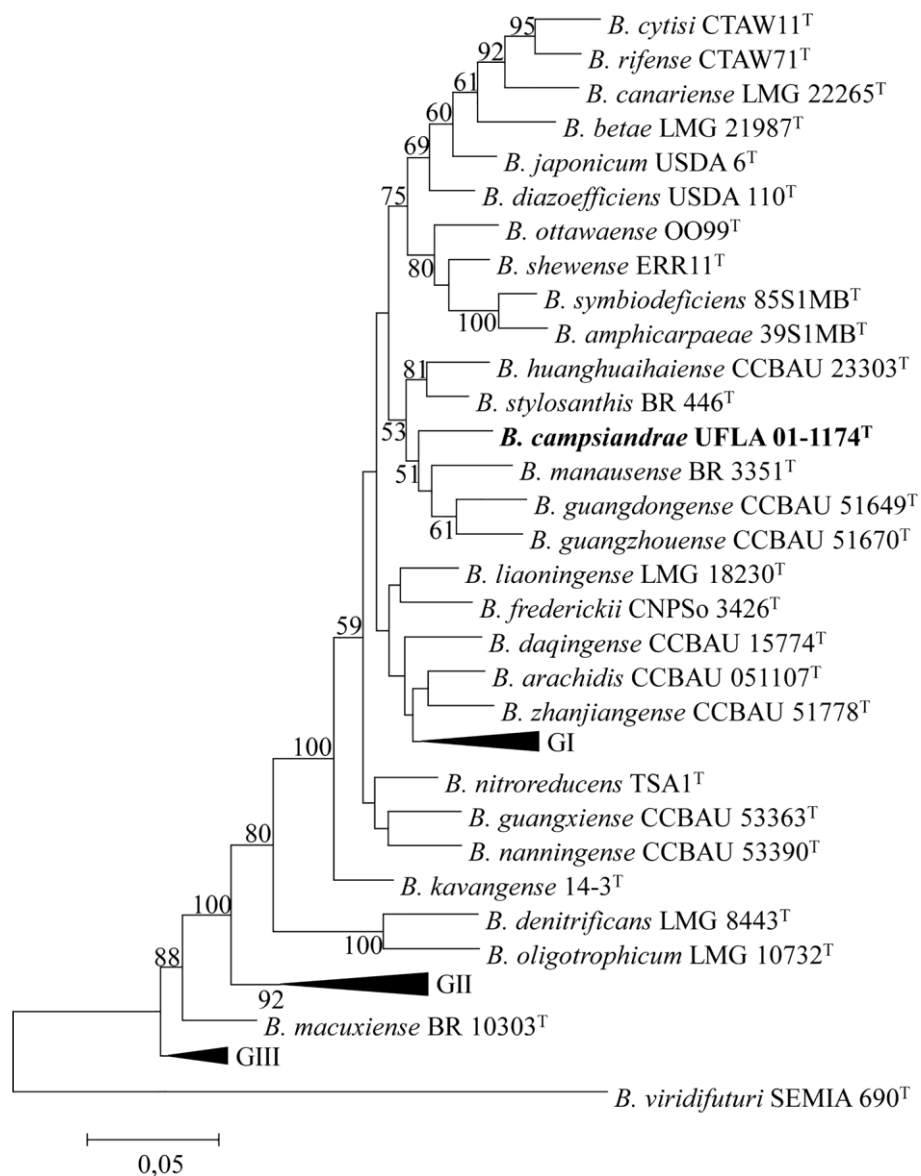


Fig. 2 Maximum likelihood phylogeny based on the concatenated *recA*, *gyrB*, *glnII*, *rpoB*, *atpD*, and *dnaK* gene sequences showing the relationship between the strain of the new species (shown in bold) and all the species described as belonging to the *Bradyrhizobium* genus. Bootstrap values greater than 50% are indicated at nodes. Bar, 5 substitutions per 100 nucleotide positions. NCBI accession numbers of the strains are listed in Table S1. GI, GII, and GIII are compressed groups of *Bradyrhizobium* species (type strains) fully listed in Table S4

ANI and G+C content

The ANI method is widely used for species delineation (Chan et al. 2012; Zhang et al. 2012; Ormeño-Orrillo et al. 2015) and it can be used to define the boundaries of bacterial species (Richter and Rosselló-Móra 2009; Yoon et al. 2017). The technique determines the evolutionary distance between a pair of strains from the similarity values of homologous genomic regions shared by the genomes (Kim et al. 2014). The cut off value considered as the species boundary is approximately 95–96% (Goris et al. 2007; Richter and Rosselló-Móra 2009). Thus, a pair of strains with a similarity percentage higher than 95% are considered to belong to the same species.

In this study, UFLA 01-1174^T was compared with *B. stylosanthis* BR 446^T, *B. manausense* BR 3351^T, and *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T, showing 88.2%, 89.1%, and 88.3% similarity between the genomes, respectively. All *Bradyrhizobium* species compared to the UFLA 01-1174^T strain showed ANI values lower than 90%, which clearly indicates that UFLA 01-1174^T represents a new species.

The G + C content in the DNA of the UFLA 01-1174^T strain obtained from the draft genome was 63.6 mol%. This percentage is within the range for the *Bradyrhizobium* genus (Kuykendall et al. 1992; Xu et al. 1995; Chahboune et al. 2011; Ramírez-Bahena et al. 2012).

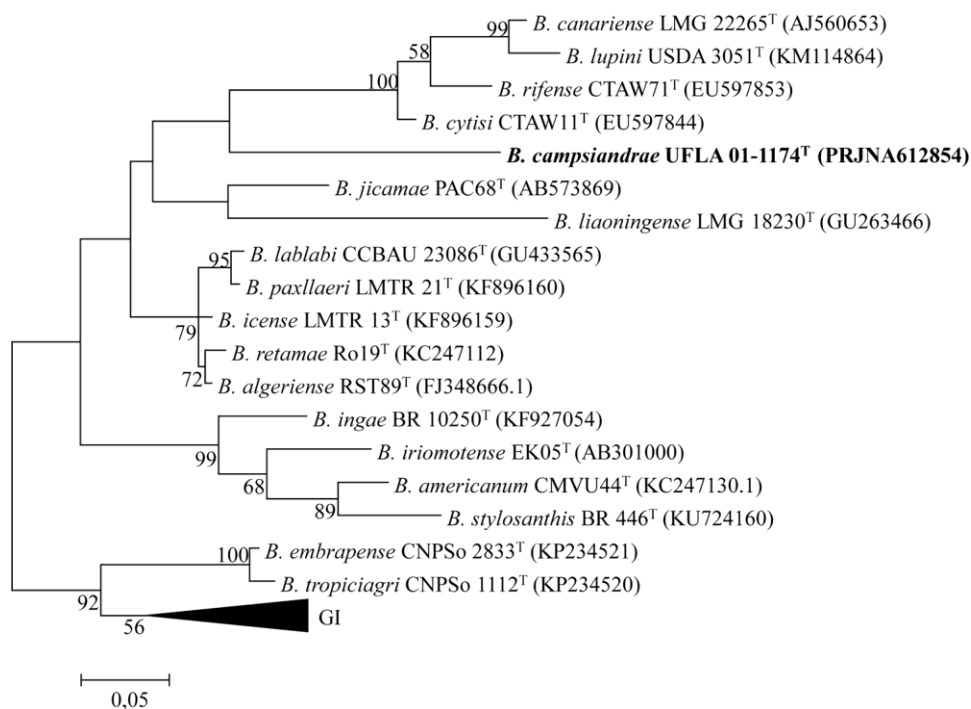


Fig. 3 Maximum likelihood phylogeny based on the *nodC* gene showing the relationship between the strain of the new species (shown in bold) and the species described as belonging to the *Bradyrhizobium* genus. Bootstrap values

greater than 50% are indicated at nodes. *Bar*, 5 substitutions per 100 nucleotides. NCBI accession numbers of the strains are provided in parentheses. GI is a compressed group of *Bradyrhizobium* species (type strains) fully listed in Table S4

Description of *Bradyrhizobium campsiandrae* sp. nov.

Bradyrhizobium campsiandrae (cam.psi.an.drae. N.L. neut. adj. *campsiandrae* of the leguminous tree species from which the strain was isolated from its nodules).

Cells are gram-negative rods (of approximately $3.4 \times 0.45 \mu\text{m}$) that are aerobic and non-spore forming. Colonies have a diameter greater than 1 mm at 5 days, are circular, and produce an alkaline reaction in medium 79 with mannitol as a carbon source and bromothymol blue as an indicator. The strain grows at pH levels from 4.0 to 10.0 and at temperatures ranging from 15 to 40 °C, with optimal growth at 28 °C. The type strain tolerates up to 0.75% NaCl. It is resistant to ciprofloxacin ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), chloramphenicol ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), erythromycin ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) and doxycycline ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). It is sensitive to ampicillin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), cefuroxime ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), kanamycin ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), gentamicin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), and neomycin ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). It assimilates D-arabinose, L-asparagine, glycerol, D-glucose, L-glutamic acid, lactose, mannitol, methionine, sodium lactate, and sucrose; and it weakly assimilates d-fructose and glutamine. It does not assimilate citric acid and glycine. In relation to nitrogen sources, it was positive for L (-) asparagine and L(-) glutamic acid; weakly positive for L(+) arginine and L(-) methionine; and negative for casein hydrolysate, L(-) cysteine, glycine, and tryptophan. The G+C content of UFLA 01-1174^T is 63.6 mol%.

The UFLA 01-1174^T (= INPA 394B^T = LMG 10099^T) type strain was isolated from effective nodules of *Campsiandra laurilifolia* Benth. from the Amazon rainforest, Brazil. The Genbank/NCBI accession numbers of the genome, 16S rRNA, *recA*, *gyrB*, *atpD*, and *dnaK* are JAANIH000000000, KU230298.1, KT793134.1, KT793146.1, KT793128.1, and KT793131.1, respectively. The *glnII* and *rpoB* genes were extracted from the UFLA 01-1174^T type strain genome.

Acknowledgements We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (CAPES/PROEX AUXPE 593/2018), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Process: 304527/2016-5; Process: 431504/2016- 4), and the Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (PACCSS/PPGCS—2009–2012) for financial support and for grant- ing scholarships. This

research is associated with the Brazilian Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Biodiversidade do Solo (Soil Biodiversity/INCT-CNPq). The authors would also like to thank the Fapemig, Capes, CNPq and Finep (Financiadora de Estudos e Projetos) for maintaining the electron microscopy laboratory and Bruna Ortiz Lopez for the great picture of the strain of this study (Fig S2).

References

- Andrews M, De Meyer S, James EK, Stepkowski T, Hodge S, Simon MF, Young JPW (2018) Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance. *Genes (Basel)* 9(7):321
- Avontuur JR, Palmer M, Beukes CW, Chan WY, Cetzee MPA, Blom J, Stepkowski T, Kyrpides NC, Woyke T, Shapiro N, Whitman WB, Venter SN, Steenkamp T (2019) Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Syst Appl Microbiol* 42:427–439
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477
- Beuker CW, Stepkowski T, Venter SN, Clapa T, Phalane FL, le Roux MM, Steenkamp ET (2016) Crotalariaeae and Genisteeae of the South African great escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. *Mol Phylogenet Evol* 100:206–218
- Castellanos C, Lewis GP (2012) Leguminosas colombianas de la subfamilia Caesalpinioideae presentes en El Herbario del Real Jardín Botánico de Kew, Reino Unido. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 36:141–192
- Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar EJ (2011) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2922–2927
- Chan JZM, Halachev MR, Loman NJ, Constantinidou C, Pallen MJ (2012) Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol* 12:302
- Ciufo S, Kannan S, Sharma S, Badretdin A, Clark K, Turner S, Brover S, Schoch CL, Kimchi A, DiCuccio M (2018) Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2386–2392
- Corrêa MP (1926) Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro Ministério da agricultura, Indústria e Comércio 1:24

- Costa EM, Guimarães AA, Vicentin RP, Ribeiro PRA, Leão ACR, Balsanelli E, Lebbe L, Aerts M, Willems A, Moreira FMS (2017) *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. *Arch Microbiol* 199:1211–1221
- Costa EM, Guimarães AA, de Carvalho TS, Rodrigues TL, Ribeiro PRA, Lebbe L, Willems A, Moreira FMS (2018) *Bradyrhizobium forestalis* sp nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Arch Microbiol* 200:743–752
- Darling AE, Mau B, Perna NT (2010) Progressive Mauve: multiple alignment of genomes with gene flux and rearrangement. *PLoS ONE* 5:e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM (1989) Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol* 111:607–619
- De Lajudie PM, Andrews M, Ardley J, Eardly B, Jumas-Bilak E, Kuzmanovic N, Lassale F, Lindström K, Mhamdi R, Martínez- Romero E, Moulin L, Mousavi SA, Nesme X, Peix A, Putawska J, Steenkamp E, Stepkowski T, Tian CF, Vinuesa P, Wei G, Willems A, Zilli J, Young P (2019) Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 69(7):1852–1863
- Durán D, Rey L, Sanchez-Cañizares C, Jorrián B, Imperial J, Ruiz-Argüeso T (2013) Biodiversity of slow-growing Rhizobia: the genus *Bradyrhizobium*. CRC Press, Boca Raton
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376
- Florentino LA, Sousa PM, Silva JS, Silva KB, Moreira FMS (2010) Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. *Rev Bras Cienc Solo* 34:1113–1123
- Fred EB, Waksman SA (1928) Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil. McGraw-Hill Book, New York, p 145
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81–91
- Herrera A, Tezara W, Rengifo E, Flores S (2008) Changes with seasonal flooding in sap flow of the tropical flood-tolerant tree species, *Campsiandra laurilifolia*. *Trees* 22(4):551–558
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9:189–197

- Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:346–351
- Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *PNAS* 7:2567–2572
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) Mega 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol* 38:501–505
- Macbride JF (1943) Flora of Peru. Field museum of natural history. Bot Ser 13(1):204
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (2011) Instrução normativa SDA nº13
- Marçais G, Delcher AL, Phillippy AM, Coston R, Salzberg SL, Zimin A (2018) MUMmer 4: a fast versatile genome alignment system. *PLoS Comput Biol* 14:e1005944
- Moreira FMS (1997) Nursery growth and nodulation of forty-nine woody legume species native from Amazonia. *Rev bras Ci Sol* 21:581–590
- Moreira FMS, Silva MF, Faria SM (1992) Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytol* 121:563–570
- Moreira FMS, Gillis M, Pot B, Kersters K, Franco AA (1993) Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst Appl Microbiol* 16:135–146
- Niemann S, Puehler A, Tichy HV, Simon R, Selbitshka W (1997) Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J Appl Microbiol* 82:477–484
- Ormeño-Orrillo E, Servín-Garcidueñas LE, Rogel MA, González V, Peralta H, Mora J, Martínez-Romero J, Martínez-Romero E (2015) Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Syst Appl Microbiol* 38(4):287–291
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genomes Res* 25:1043–1055
- Ramírez-Bahena MH, Chahboune R, Peix A, Velázquez E (2012) Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1013–1016
- Remigi P, Zhu J, Young PW, Masson-Boivin C (2016) Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends Microbiol* 24(1):63–75

- Rengifo E, Tezara W, Herrera A (2005) Water relations, chlorophyll α fluorescence, and contents of saccharides in tree species of a tropical forest in response to flood. *Photosynthetica* 43(2):203–210
- Ribeiro PRA, Santos JV, Costa EM, Lebbe L, Louzada MO, Guimarães AA, Assis ES, Willems A, Moreira FMS (2015) Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agr Ecosyst Environ* 212:85–93
- Richter M, Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19126–19131
- Rivas R, García-Fraile P, Velázquez E (2009a) Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiol Insights* 2:3137
- Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A (2009b) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 32:101–110
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Silva FV, De Meyer SE, Simões-Araújo JL, Barbé TC, Xavier GR, O'Hara G, Ardley JK, Rumjanek NG, Willems A, Zilli JE (2014) *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazon rainforest soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:2358–2363
- Sprent JI, Parsons R (2000) Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crop Res* 65:183–196
- Sprent JI, Ardley J, James EK (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol* 215:40–56
- Stergios B (1996) Contributions to South American Caesalpiniaceae II. A Taxonomic Update of *Campsiandra* (Caesalpinieae) [https:// www.jstor.org/stable/3392055](https://www.jstor.org/stable/3392055)
- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Mol Biol Evol* 9:678–687
- Ulibarri EA (2008) Los géneros de Caesalpinioideae (Leguminosae) presentes en Sudamérica. *Darwiniana* 46(1):69–163
- Vieira DS, Oliveira MLR, Gama JRV, Machado ELM, Görgens EB, Lafetá BO, Garcia JS (2017) Phytosociology of a natural fragment of the floodplain forest in the lower Tapajós River, Brazil. *Bosque* 38:357–369
- Willems A, Coopman R, Gillis M (2001) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:111–117
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 45:706–711

Yoon S-H, Ha S-M, Lim J, Kwon S, Chun J (2017) A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110:1281–1286

Zhang YM, Tian CF, Sui XH, Chen WF, Chen WX (2012) Robust markers phylogeny and taxonomy of rhizobia. *PLoS ONE* 7: e44936

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Archives of Microbiology

Supplementary material

***Bradyrhizobium campsiandrae* sp nov., a nitrogen-fixing bacterial strain isolated from a native leguminous tree from the Amazon adapted to flooded conditions**

Daniele Cabral Michel, Elaine Martins da Costa, Amanda Azarias Guimarães, Teotonio Soares de Carvalho, Polyane Santos de Castro Caputo, Anne Willems, Fatima Maria de Souza Moreira*

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail address: fmoreira@ufla.br (F.M. de Souza Moreira).

Table S1. Genbank accession number of housekeeping genes of the type strains of *Bradyrhizobium* genus and from *Bradyrhizobium campsiandrae* UFLA 01-1174^T. Some housekeeping genes were extracted from species genomes

Strains	genome	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>
<i>B. campsiandrae</i> UFLA 01-1174^T	JAANIH000000000	KT793146.1	KT793134.1	JAANIH000000000	JAANIH000000000	KT793128.1	KT793131.1
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	NZ_LGTB00000000.1	KR149140	KR149134	KR149131	NZ_LGTB00000000.1	NZ_LGTB00000000.1	KR149128
<i>B. arachidis</i> CCBAU 0511107 ^T		HM107233	JX437675	HM107251	JX437682	HM107217.1	JX437668
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T		AB353734	FM253217	AB353733	FM253260	FM253129.1	FM253303.1
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T		FM253177	FM253220	AY386765	FM253263	FM253135.1	AY923047
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T		GU001575	KF532653.1	GU001594	JN186288	GU001613.1	JQ945184
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T		HQ231270	JX437669	HQ231301	JX437676	HQ231289.1	KF962684
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T		FM253196	FM253239	HM047121	FM253282	FM253153.1	KF962685
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	ASM37914V1	AY591568	AM418800.1	AY599117	AM295348	ASM37914V1	AY328392
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T		HQ231595	JX437672	HQ231639	LM994169	HQ231682.1	JX437665
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T		JX943615	KF896201	KF896175	NZ_CP016428.1	KF896192.1	KF896182
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T		KF927061	KF927079	KF927067	KF927073	KY753593.1	KF927055
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T		AB300996	AB300997	AB300995	HQ587646	LM994395.1	JF308944
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T		AM182158	AB070586.1	HQ587875	AM295349	AM418753.1	AM182120
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T		HM047133	HQ873309	FJ428204	HQ587647	FJ428211.1	JF308945
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T		GU433522	JX437670	GU433498	JX437677	GU433473.1	KF962687
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T		FM253180.1	FM253223	AY386775	FM253266	AY386752.1	AY923041
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	NZ_LJYG00000000.1	KF785992	KF786000	KF785986	NZ_LJYG00000000.1	NZ_LJYG00000000.1	KF786001
<i>B. neotropicale</i> BR 10247 ^T	NZ_LSEF00000000.1	KJ661714	KJ661707	KJ661700	KF983829	NZ_LSEF00000000.1	KJ661693
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T		JQ619231	KF962697	JQ619233	KF962713	JQ619232.1	KF962688
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T		HQ587287	HQ873179	HQ587750	HQ587518	HQ455212.1	JF308816
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T		HM047130	HQ873310	FJ428201	HQ587648	FJ428208.1	JF308946
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T		JX943617	KF896195	KF896169	KP308154	KF896186.1	AY923038
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T		KF962711	KF896204	KC247108	KF962714	KC247101.1	KF896184
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T		GU001585	KC569466	GU001604	KC569468	GU001617.1	JQ945187
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T		FM253183	FM253226	AY386780	FM253269	AY386760.1	FM253312.1
<i>B. embrapense</i> CNPSO 2833 ^T		HQ634899	HQ634891	GQ160500	HQ634910	HQ634875.1	KP234519

<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T		KC509269	KC509072	KC509023	KC509318	KC508916.1	KC508964
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T		KC509279	KC509082	KC509033	KC509328	KC508926.1	KC508974
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T		KM378399	KX661397.1	KM378446	KM378311	KX661392.1	KR259949
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	NZ_RDQF00000000.1	JX518589	NZ_RDQF00000000.1	JX518575	NZ_RDQF00000000.1	JX518561.2	NZ_RDQF00000000.1
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	NZ_RDQF00000000.1	KM378374	NZ_RDQF00000000.1	KM378443	KM378308	NZ_RDQF00000000.1	KR259951
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463
<i>B. tropiciagri</i> CNPSO 1112 ^T		FJ391168	HQ634890	FJ391048	HQ634909	FJ390968.1	FJ391008
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	NZ_MKFI01000001.1	KX690615.1	KX690623	KX690621.1	NZ_MKFI01000001.1	NZ_MKFI01000001.1	KX690617
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	KF452722.1	PGVG00000000
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	NZ_LVEM00000000.1	KU724163.1	KU724151.1	KU724148.1	KU724166	NZ_LVEM00000000.1	KU724145
<i>B. shewense</i> ERR11 ^T	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	NZ_LUUB00000000.1	KX527954.1	KX528004.1	KX527991.1	KF983827.3	NZ_LUUB00000000.1	KX527928.1
<i>B. brasiliense</i> UFLA 03- 321 ^T	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	NZ_LNCU01000024.1	KX527958.1	KX528008.1	KX527995.1	KX527969.1	NZ_LNCU01000024.1	KX527932.1
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T		KM378377.1	KX661393.1	KM378440.1	KM378306.1	KX661387.1	KP402058.1
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	ASM306228v1	FJ264927.1	ASM306228v1	FJ264924.1	ASM306228v1	ASM306228v1	FJ264922.1
<i>B. frederickii</i> CNPSO 3426 ^T	ASM457086v1	MK682710.1	MK682721.1	MK682688.1	MK682699.1	ASM457086v1	ASM457086v1
<i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T	ASM411453v1	KC509274	KC509077.1	KC509028	KC509323.1	KC508921.1	KC508969
<i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T	ASM411495v1	KC509254	KC509057.1	KC509008	KC509303.1	KC508902.1	KC508950
<i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	ASM411493v1	KC509263	KC509066.1	KC509017	KC509312.1	KC508911.1	KC508959
<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T	CP029427	KF615036	KP768725	KP768609	KP768667	KP768551	CP029427
<i>B. amphicarpace</i> 39S1 MB ^T	CP029426	KF615002.1	KP768721	KP768605	KP768663	KP768547.1	CP029426

Table S2. Percentage of similarity between the type strain UFLA 01-1174^T and all *Bradyrhizobium* species described

Strains	Similarity with <i>B. campsiandrae</i> UFLA 01-1174 ^T (%)									
	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	six genes*	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	97.1	92.5	89.2	74.7	95.3	90.9	82.8	84.3	-	97.9
<i>B. arachidis</i> CCBAU 0511107 ^T	98.0	95.2	87.5	90.3	97.3	94.5	84.2	91.5	80.6	96.4
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	99.3	89.4	87.7	91.7	79.8	94.3	93.1	88.8	-	-
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	98.8	90.0	89.2	90.9	82.4	92.4	82.6	88.8	70.1	95.5
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	99.3	87.9	86.9	91.3	92.2	92.6	94.2	88.0	83.7	97.9
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	98.9	89.0	89.2	88.7	95.7	93.8	86.5	91.6	84.7	77.2
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	97.7	84.9	80.8	80.5	95.4	90.7	87.8	83.9	-	91.6
<i>B. elkani</i> USDA 76 ^T	96.8	91.4	90.3	77.0	98.0	87.3	81.9	85.5	76.1	97.9
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	99.7	89.0	88.7	94.4	-	94.3	93.3	-	-	89.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	98.2	89.0	87.9	95.8	94.2	95.7	86.0	93.6	-	77.2
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	97.0	87.4	80.4	81.5	96.4	88.1	86.1	82.7	84.0	97.4
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	97.9	84.7	83.7	93.6	94.0	90.3	93.5	86.9	79.7	95.5
<i>B. iriomotense</i> _EK05 ^T	97.9	86.8	86.9	91.0	96.7	89.5	95.8	87.1	78.8	96.4
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	98.9	88.7	89.2	94.5	87.9	91.5	85.6	92.0	84.7	77.2
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	96.8	84.2	82.8	80.9	94.1	91.4	87.2	82.0	79.0	93.0
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	96.9	89.3	81.8	81.1	96.6	89.5	88.1	83.3	83.5	96.9
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	99.0	92.9	89.5	92.4	96.6	94.2	84.8	92.5	84.7	77.2
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	99.7	88.9	85.5	89.5	96.6	94.1	95.9	93.7	-	96.4
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T	96.0	90.7	86.6	87.9	96.2	91.9	92.2	89.7	-	94.8
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	98.1	87.4	82.0	77.3	97.5	87.7	86.8	83.9	-	-
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	98.9	91.0	89.0	91.0	96.6	94.2	84.7	91.9	84.7	77.2
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	96.8	91.6	90.5	76.1	98.4	87.8	81.9	85.3	84.7	97.9
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	97.0	84.4	81.2	81.7	95.7	89.7	88.1	82.4	84.2	96.9
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	97.2	87.2	79.9	80.2	98.4	85.9	81.8	82.0	83.6	97.4
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	99.6	89.5	88.8	92.9	91.0	95.3	94.2	88.8	78.4	97.9
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	98.5	90.7	86.8	90.0	97.5	92.1	83.8	90.4	70.7	81.7
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	97.1	90.8	89.2	77.7	97.0	87.9	82.8	84.3	82.8	97.9
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	99.8	92.8	92.2	88.1	97.1	93.4	90.0	93.1	-	97.9
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	99.3	93.4	87.8	86.1	98.4	93.1	84.2	92.3	-	96.9
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	97.3	87.4	88.8	89.4	93.2	91.8	83.3	91.7	-	95.9
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	96.8	89.9	79.2	71.2	97.1	86.1	87.1	79.4	-	97.4
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	99.3	88.7	84.7	89.4	98.4	91.6	90.7	90.5	-	94.9
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	98.9	88.0	-	90.0	97.5	90.9	90.8	-	-	97.9
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	97.1	92.4	86.1	78.3	97.1	-	-	-	-	96.5
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	94.6	92.2	85.0	76.0	98.2	-	-	-	78.4	97.9
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	99.3	88.7	91.3	94.3	93.7	95.7	84.2	92.8	84.7	77.2
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	96.0	92.2	89.2	76.8	95.6	87.3	82.3	84.3	83.3	97.9
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	97.1	93.6	87.6	77.3	98.4	88.6	83.2	84.1	-	97.2
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	98.9	88.7	84.8	90.1	97.5	90.7	92.6	90.3	-	96.9
<i>B. americanum</i> CMVU 44 ^T	98.9	89.1	-	89.2	-	94.2	-	-	81.9	93.7
<i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T	98.6	89.0	-	87.3	-	-	-	-	81.1	-
<i>B. centrosemae</i> A9 ^T	99.3	93.3	-	87.4	-	94.1	-	-	73.3	90.2
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	98.4	95.5	87.9	95.6	95.3	95.9	87.0	94.4	84.7	97.9
<i>B. lupini</i> USDA 3051 ^T	98.6	90.8	-	89.9	98.4	-	-	-	71.1	-
<i>B. shewense</i> ERR11 ^T	99.1	92.1	90.6	91.7	97.9	94.2	84.2	92.3	-	-
<i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T	97.9	86.6	-	94.4	-	94.8	84.2	-	-	-
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	95.6	89.1	86.4	90.1	98.4	92.8	93.5	90.3	-	97.5
<i>B. brasiliense</i> UFLA 03-321 ^T	96.8	90.8	89.8	76.9	98.4	86.2	81.4	85.3	-	-
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	96.7	90.0	87.2	80.0	97.2	88.9	84.6	85.4	-	97.9
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	97.0	85.4	83.3	81.5	94.0	90.9	91.2	83.4	-	97.9
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	99.3	92.1	92.4	86.7	96.7	95.5	84.2	92.3	-	-
<i>B. ripae</i> WR4 ^T	96.8	92.8	88.2	-	97.1	-	84.6	-	-	-
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	97.2	89.9	78.7	75.4	98.4	87.8	85.7	80.3	84.7	97.9
<i>B. frederickii</i> CNPSo 3426 ^T	99.3	91.9	84.0	91.9	96.4	96.9	86.3	92.0	84.7	97.9
<i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T	99.3	92.7	89.1	87.1	95.3	91.9	87.2	91.4	-	86.9
<i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T	99.8	95.9	86.1	84.4	93.6	94.2	95.4	93.3	-	97.9
<i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	97.4	90.2	90.7	89.0	96.8	92.9	90.7	91.2	-	97.9
<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T	98.9	86.4	90.0	92.7	96.2	93.5	84.2	90.5	-	-
<i>B. amphicarpaee</i> 39S1MB ^T	98.9	86.9	89.1	91.7	96.2	93.8	84.7	90.1	-	92.1
<i>B. thioxidans</i> DSM 9653 ^T	91.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Concatenation of the genes *recA*, *gyrB*, *glnII*, *rpoB*, *atpD*, and *dnaK*.

Table S3. Main phenotypic characteristics of UFLA 01-1174^T type strain

Characteristics	
Growth at	
40°C	+
pH 4.0	+
0.75% NaCl	+
C source utilization	
D-arabinose	+
L-asparagine	+
Mannitol	+
Malic acid	-
Citric acid	-
Assimilation of nitrogen source	
_L (-) Asparagine	+
L (-) Glutamic acid	+
Glycine	-
Tryptophan	-
Antibiotic resistance (µg mL ⁻¹)	
Ciprofloxacin (5)	+
Erythromycin (15)	+
Chloramphenicol (30)	+
Ampicillin (10)	-
Kanamycin (30)	-
Gentamicin (10)	-

+ growth, - not growth. For Antibiotics + resistant, - susceptible.

Table S4. Groups of *Bradyrhizobium* species (type strains) in the phylogenetic trees of 16S rRNA, MLSA (multilocus sequence analysis) and *nodC* genes

16S rRNA	GI	<i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T , <i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T , <i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T , <i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T , <i>B. kavangense</i> 14-3 ^T , <i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T , <i>B. ingae</i> BR 10250 ^T , <i>B. iriomotense</i> EK05 ^T , <i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T
	GII	<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T , <i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T
	GIII	<i>B. retamae</i> Ro19 ^T , <i>B. algeriense</i> RST89 ^T , <i>B. jicamae</i> PAC68 ^T , <i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T , <i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T , <i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T , <i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T , <i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T , <i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T , <i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T , <i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T , <i>B. namibiense</i> 5-10 ^T , <i>B. icense</i> LMTR 13 ^T , <i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T , <i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T , <i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T , <i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T , <i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T , <i>B. brasilense</i> UFLA 03-321 ^T , <i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T , <i>B. ripae</i> WR4 ^T
MLSA	GI	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T , <i>B. forestalis</i> INPA54B ^T , <i>B. vignae</i> 7-2 ^T , <i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T , <i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T , <i>B. ingae</i> BR 10250 ^T , <i>B. iriomotense</i> EK05 ^T
	GII	<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T , <i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T , <i>B. algeriense</i> RST89 ^T , <i>B. icense</i> LMTR 13 ^T , <i>B. retamae</i> Ro19 ^T , <i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T , <i>B. jicamae</i> PAC68 ^T , <i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T
	GIII	<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T , <i>B. brasilense</i> UFLA 03-321 ^T , <i>B. elkanii</i> USDA76 ^T , <i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T , <i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T , <i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T
<i>nodC</i>	GI	<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T , <i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T , <i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T , <i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T , <i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T , <i>B. frederickii</i> CNPSo 3426 ^T , <i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T , <i>B. centrosemiae</i> A9 ^T , <i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T , <i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T , <i>B. ottawaense</i> OO99 ^T , <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T

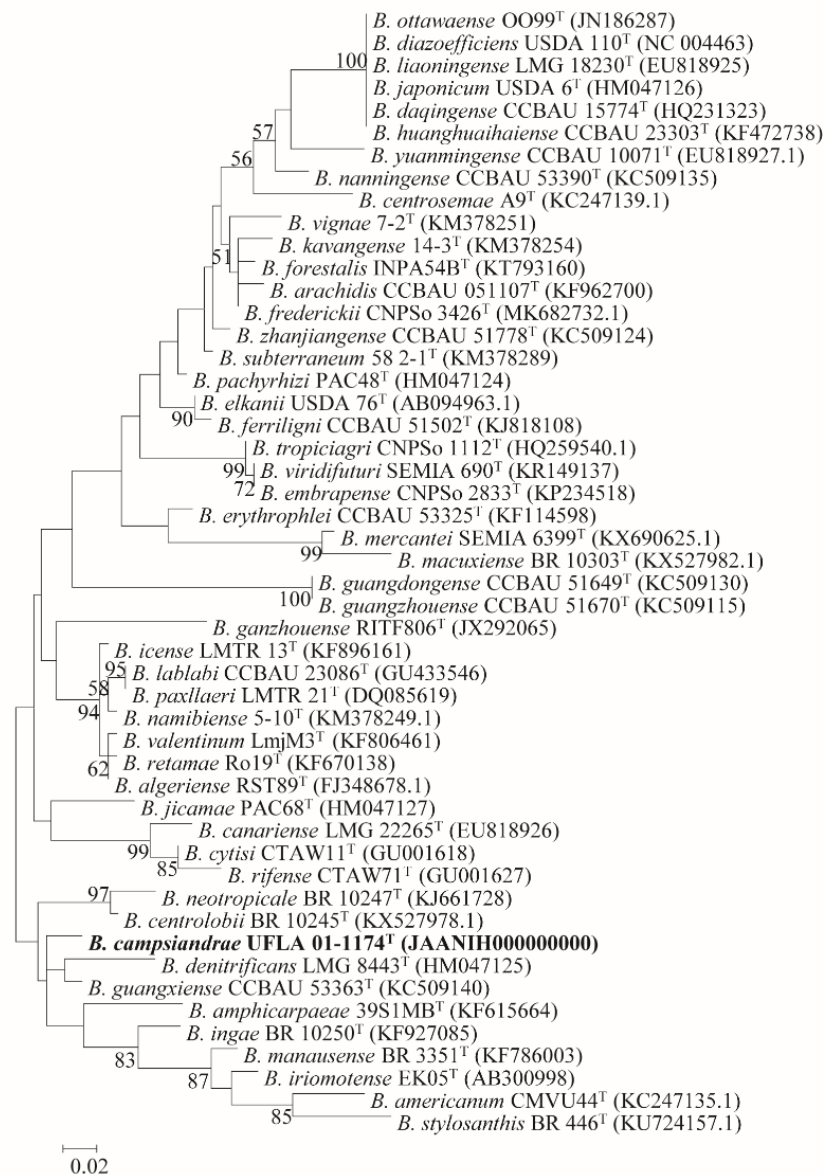


Fig. S1 Maximum likelihood phylogeny based on *nifH* gene sequence showing the relationship between the type strain of new species *B. campsiandrae* (shown in bold) and other *Bradyrhizobium* species. Bootstrap values greater than 50% are indicated at nodes. Bar, 2 substitutions per 100 nucleotide positions. Gene accession number for each strain are provided in parentheses

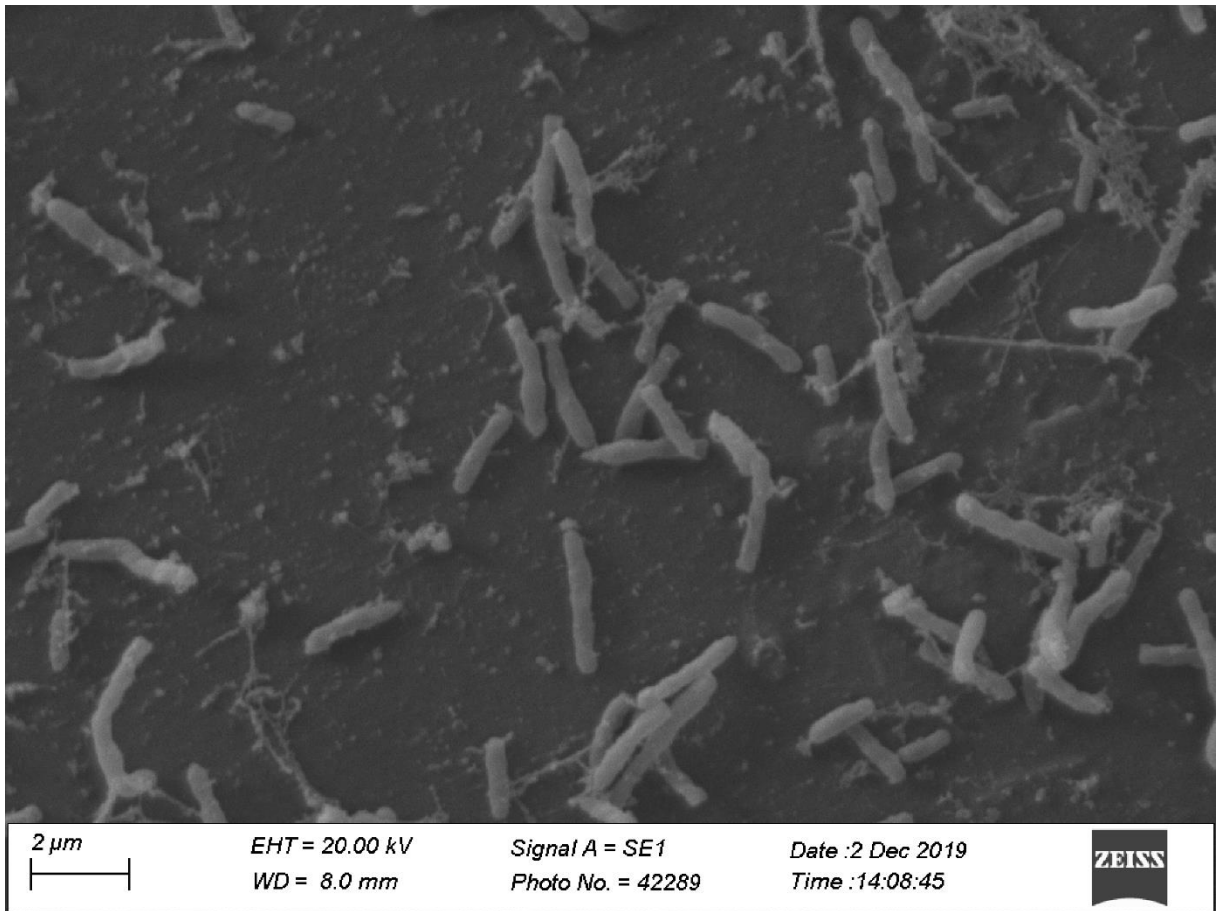


Fig. S2 Electron micrograph image from the type strain UFLA 01-1174^T (10000x of resolution). Author: Bruna Daniela Ortiz Lopez

ARTIGO 3 - Genômica comparativa e estudo evolutivo de genes *nod* anotados em 38 estirpes de *Bradyrhizobium* simbiotes de *Arachis pintoi*, *Glycine max* e *Phaseolus lunatus* L.

Artigo de acordo com as normas da revista Archives of Microbiology

1 **Genômica comparativa e estudo evolutivo de genes *nod* anotados em 38 estirpes de**
2 ***Bradyrhizobium* simbiontes de *Arachis pintoi*, *Glycine max* e *Phaseolus lunatus* L.**

3

4 Daniele Cabral Michel¹ (ORCID: 0000-0001-8347-1956), Teotonio Soares de Carvalho¹ (ORCID: 0000-0001-
5 6631-5177), Konstantinos T. Konstantinidis² (ORCID: 0000-0002-0954-4755) Fatima Maria de Souza Moreira^{1*}
6 (ORCID: 0000-0003-0159-5811)

7

8 ¹Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade
9 Federal de Lavras, Campus UFLA, 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

10 ²Professor da Georgia Institute of Technology, Laboratório de Genômica Microbiana Ambiental, Georgia, Estados
11 Unidos.

12

13 *Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail address: fmoreira@ufla.br (F.M.
14 de Souza Moreira).

15

16 **Resumo**

17 Neste estudo, os genomas de 38 estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e simbiontes de soja
18 (*Glycine max* L.), feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) e amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) provenientes de
19 diferentes regiões brasileiras foram sequenciados para efetuar a análise de genômica comparativa e filogenia
20 molecular dessas bactérias das estirpes tipo das espécies já descritas do gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes em
21 estudo, de cada uma das três espécies de leguminosas, formaram clados com espécies de *Bradyrhizobium* já
22 existentes e clados independentes. Dentro dos clados independentes, foram identificadas cinco novas espécies,
23 sendo três oriundas do amendoim, uma de soja e de feijão-fava. As estirpes se agruparam em função das suas
24 espécies vegetais hospedeiras. A matriz de similaridade baseada na identidade média de nucleotídeos (ANI),
25 mostrou resultados similares a árvore filogenética construída a partir dos genomas e permitiu a identificação de
26 três novas espécies isoladas do grupo do amendoim forrageiro, uma nova espécie do grupo da soja e uma nova
27 espécie do feijão-fava. A filogenia dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*, *nodN*, *nodZ* e *nodW*
28 mostraram agrupamento das estirpes muito similares ao longo das árvores e todas se agruparam de acordo com as
29 plantas hospedeiras de onde foram selecionadas. Neste trabalho observou-se que as estirpes isoladas de cada uma
30 das espécies de leguminosa mostraram uma história evolutiva muito similar entre elas no que diz respeito aos
31 genes de nodulação.

32 **Palavras-chave:** FBN, leguminosas, ANI, genes nodulíferos.

33

34

35 **Introdução**

36 A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo reconhecidamente importante para a natureza
37 pois através dele o nitrogênio atmosférico (na forma de N_2) é disponibilizado às plantas na forma de amônia
38 (NH_3^+). As bactérias fixadoras de N_2 (BFN) podem viver livres no solo, associadas a rizosfera, endofiticamente
39 (colonizando os tecidos das plantas) e de forma simbiótica, como no caso de leguminosas e rizóbios (MOREIRA;
40 SIQUEIRA, 2006). Essa interação resulta na formação de estruturas especializadas denominadas nódulos, onde
41 ocorre a fixação biológica de N_2 .

42 A simbiose rizóbio-leguminosa está entre os mecanismos mais evoluídos de FBN. Essa interação tem
43 uma história evolutiva antiga que vem se remodelando ao longo de milhares de anos. No entanto, para o
44 desenvolvimento e manutenção de nódulos, as plantas utilizam uma variedade de mecanismos moleculares. Uma
45 via de autoregulação da nodulação controla a nodulação sistêmica (FERGUSON et al., 2018). Esta via envolve a
46 produção de peptídeos específicos codificados por genes.

47 Dentro do grupo dos rizóbios, diversas espécies pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, têm sido
48 descritas nos últimos anos. Elas compreendem estirpes isoladas de diferentes países, continentes ao longo do
49 mundo. São capazes de nodular as mais variadas espécies de leguminosas, incluindo as com fins agrícolas, pastejos
50 e até arbóreas. Atualmente existem 14 espécies de *Bradyrhizobium* descritas, oriundas de leguminosas de solos
51 tropicais brasileiros: *B. ingae* (da SILVA et al., 2014), *B. neotropicale* (ZILLI et al., 2014) *B. manausense* (SILVA
52 et al., 2014), *B. viridifuturi* (HELENE et al., 2015) *B. tropiciagri* (DELAMUTA et al., 2015), *B. stylosanthis*
53 (DELAMUTA et al., 2016), *B. mercantei* (HELENE et al., 2017), *B. sacchari* (de MATOS et al., 2017), *B.*
54 *forestalis* (COSTA et al., 2018), *B. brasilense* (COSTA et al., 2017), *B. centrolobii* (MICHEL et al., 2017), *B.*
55 *macuxiense* (MICHEL et al., 2017), *B. uaiense* (MICHEL et al., 2020), *B. campsiandrae* (MICHEL et al., 2021).

56 Os avanços e o barateamento no sequenciamento de genomas permitiram ao longo dessas duas últimas
57 décadas, que o número de sequências genômicas de plantas e de microrganismos no banco de dados crescesse
58 consideravelmente. Tais fatos contribuíram para o melhor entendimento do aparato genético que esses organismos
59 utilizam para que a FBN ocorra. Diversas abordagens têm sido utilizadas para definir e entender o envolvimento
60 de genomas bacterianos no processo simbiótico (MACLEAN et al. 2007; MASSON-BOIVIN et al. 2009; TIAN
61 et al. 2012) e nos últimos anos tem sido identificado diversos genes envolvidos no processo de nodulação. Entre

62 eles estão os genes responsáveis pelos fatores Nod que compreendem os genes *nodA*, *nodB*, *nodC* (PERRET et al.
63 2000; GNAT et al. 2015) e os genes *nodD*, *nodI*, *nodJ* (REMIGI et al. 2016; MERGAERT et al. 2020) que estão
64 sendo avaliados neste estudo.

65 Diversas técnicas têm sido utilizadas para a comparação de genomas e para a construção da filogenia de
66 procariotos. Métodos de genômica comparativa como o ANI, identifica a identidade média de nucleotídeos entre
67 duas estirpes, fornecendo de forma robusta o parentesco genético entre as estirpes (KONSTANTINIDIS et al.
68 2005). Esta metodologia tem sido bastante aplicada para a descrição de novas espécies de procariotos (COSTA et
69 al. 2018; REJILI et al. 2020; BROMFIELD; CLOTIER 2021). As análises filogenéticas têm tornado possível o
70 entendimento das relações taxonômicas entre os microrganismos e permite entender como alguns genes estão
71 sendo transmitidos ao longo do tempo . Em um estudo recente de filogenia com os genes *nodABC* observou-se
72 que tais genes agruparam os gêneros *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* em clados monofiléticos, distintos das
73 sequencias dos outro clados formados pelos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (RAHIMLOU et al. 2021). Este
74 trabalho mostra que gêneros distintos podem possuir uma mesma ancestralidade para genes como *nodABC*.

75 Em *Bradyrhizobium*, tem sido sequenciado genomas de vários nichos ecológicos, incluindo os genomas
76 de estirpes nodulíferas de várias espécies de leguminosas (TEULET et al. 2020). A partir de um estudo com este
77 gênero de microrganismos, observou-se que a maioria dos clados formado por ele estabeleceu simbiose, no início
78 de sua evolução, com conjuntos muito divergentes de leguminosas hospedeiras. Porém, ao longo do tempo
79 desenvolveu um padrão mais estreito de uso de hospedeiras. (PARKER et al. 2015). O sequenciamento dos
80 genomas de estirpes de *Bradyrhizobium* e o entendimento deste gênero mais onipresente e abundante nos solos
81 (DELGADO et al. 2018) permite entender melhor quais genes presentes nos genomas são utilizados para a
82 nodulação e fixação biológica de nitrogênio e sua relação com seus hospedeiros de origem .

83 Dessa forma, estudos filogenéticos e genômicos tem sido cada vez mais aplicados na ciência. Pesquisas
84 com o gênero *Bradyrhizobium* tem se tornado recorrentes visto que é bastante eficaz na FBN com espécies de
85 interesse agrícola, como *Phaseolus lunatus* L., *Arachis pintoie* *Glycine max*. Informações sobre os genomas dos
86 simbioses nas duas primeiras espécies de leguminosas são poucas. No entanto, na soja, informações genômicas
87 de alguns organismos do gênero já existem na literatura (KANEKO et al., 2011; KANEHARA et al.,
88 2016). Informações a respeito do aparato genético desses microrganismos que estabelecem simbiose com essas três
89 leguminosas é de extrema importância visto que são culturas de grande relevância no cenário nacional e mundial.
90 O feijão-fava é a segunda espécie mais consumida no mundo, dentro do gênero *Phaseolus*. O amendoim-forrageiro

91 não só é utilizado como forragem, mas também é muito utilizada em consórcios com outras plantas e , a soja é
92 uma cultura de extreme relevância para a economia brasileira e bastante consumida mundialmente.

93 O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de *Bradyrhizobium* que formam simbiose com as
94 leguminosas *Arachis pintoi*, *Phaseolus lunatus* L. e *Glycine max*; verificar a diversidade de simbioses em cada
95 uma dessas espécies; identificar a presença dos genes *nod* até hoje relatados em espécies de rizóbio, além das
96 estirpes de *Bradyrhizobium* e relacionar a dos genes *nod* com a filogenia do genoma bacteriano e com a identidade
97 das espécies hospedeiras.

98

99 **Material e métodos**

100 **Origem das estirpes**

101 Foram selecionadas estirpes isoladas de nódulos de amendoim forrageiro e soja e comprovadamente
102 capazes de nodular essas espécies em condições axênicas (SÁ et al 2019; RIBEIRO et al 2019). No caso do feijão-
103 fava, além de estirpes isoladas dessa espécie e comprovadamente capazes de nodular-la em condições axênicas
104 (RODRIGUES et al. 2021) foram também incluídas estirpes de outras espécies de leguminosas que foram capazes
105 de nodular feijão-fava (COSTA et al 2017). As estirpes capazes de nodular cada espécie vegetal, tiveram origens
106 geográficas diferentes (Tabela 1; Fig. 1). O isolamento e caracterização das estirpes foram feitos em meio 79
107 (FRED; WAKSMAN, 1928). Todas as estirpes em estudo se encontram depositadas na coleção de bactérias do
108 Setor de Biologia do Solo, Microbiologia e Processos Biológicos na UFLA

109

110 **Sequenciamento e montagem dos genomas**

111 Para obter as sequências dos genomas das 38 estirpes, elas foram crescidas em meio 79 líquido por 4-5
112 dias. Após esse tempo de crescimento, uma alíquota de 1 mL desse meio foi transferida para microtubos para a
113 extração de DNA, de acordo com o protocolo do kit de Purificação de DNA Wizard® da Promega. O preparo da
114 biblioteca de DNA genômico foi realizado utilizando o kit de biblioteca NexteraXT (Illumina, CA, USA), seguindo
115 as instruções do fabricante. A quantidade final da biblioteca foi medida através de KAPA SYBR® FAST qPCR
116 com o sistema QuantStudio® 5 (Applied Biosystems, CA, USA). A biblioteca foi avaliada pelo TapeStation
117 HSD1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, USA). Os índices Illumina® 8-nt dual foram usados. Baseado
118 em valores de controle de qualidade, a junção equimolar de bibliotecas foi realizado e as leituras dos fragmentos
119 foram feitas em dois sentidos (2x150 bases) na plataforma Illumina® HiSeq X (Illumina, CA, EUA). A montagem

120 dos genomas foi feita utilizando o algoritmo SPADes 3.13.0 (BANKEVICH et al. 2012). A qualidade e completude
121 foram checadas através do CheckM 1.0.18 (PARKS et al. 2015). As características gerais dos genomas se
122 encontram na tabela S1.

123

124 **Análise filogenética dos genomas e matriz ANI (average nucleotide identity)**

125 Com o propósito de identificar relações filogenéticas entre as 38 estirpes deste estudo e as estirpes tipo
126 das espécies já descritas no gênero *Bradyrhizobium* foi construída uma árvore filogenética a partir dos seus
127 genomas, utilizando os procedimentos a seguir na plataforma kbase (<https://www.kbase.us/>): 1) Agrupar um
128 conjunto de genomas com o aplicativo Build a genome set v1.7.6 (ARKIN et al. 2018); 2) Construir a árvore
129 filogenética a partir do conjunto de genomas, utilizando o aplicativo Insert set of Genomes into Species tree v.2.2.0
130 (PRICE et al. 2010). Neste último algoritmo, a árvore filogenética foi construída a partir de um conjunto de 49
131 genes centrais, ou seja, genes universais amplamente ocorrentes em procariotos, definidos por famílias de genes
132 COG (Cluster of Orthologous Groups). Para isso, as sequências em estudo são previamente inseridas em um
133 alinhamento múltiplo curado de sequências (MSA) já existente no banco de dados utilizado pelo kbase. As
134 sequências alinhadas são, posteriormente, cortadas usando o GBLOCKS (CASTRESANA, J. 2000; TALAVERA;
135 CASTRESANA, 2007). Essa ferramenta elimina posições mal alinhadas e regiões divergentes do alinhamento de
136 sequências de DNA. O modelo estatístico utilizado para a construção da árvore filogenética foi o *maximum*
137 *likelihood* (FELSENSTEIN 1981).

138 A fim de determinar o percentual de identidade média de nucleotídeos de genes para comparar a relação
139 genética entre estirpes e identificá-las a nível de espécie, os 38 genomas em estudo mais os genomas de 60 estirpes
140 tipo de espécies já descritas de *Bradyrhizobium* (junho/2021) foram inseridos na matriz do ANI. Esta matriz foi
141 construída na plataforma <http://enve-omics.ce.gatech.edu/>. Grupos consistentes, a nível de espécie, são destacados
142 em retângulos vermelhos ($\geq 95\%$ ANI). Os códigos dos genomas das espécies de *Bradyrhizobium* utilizadas nessa
143 análise também estão presentes na Tabela S1. A matriz completa do ANI está no material suplementar Fig. S7.

144

145 **Anotação genômica**

146 Com o intuito de identificar genes relacionados a nodulação genomas das 38 estirpes foram anotados
147 para a identificação dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodE*, *nodF*, *nodI*, *nodJ*, *nodK*, *nodL*, *nodM*, *nodN*,

148 *nodO*, *nodV*, *nodW* e *nodZ* (Tabela S3). Para a anotação desses genes foi utilizado o programa RAST (AZIZ et
149 al. 2008) dentro da plataforma Kbase (<https://www.kbase.us/>). Utilizando o RAST, foram encontrados os genes
150 *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*, *nodN*. Em adição, utilizou-se o Microbeannotator (RUIZ-PEREZ et al.
151 2021) para encontrar os genes *nodV*, *nodW* e *nodZ*. O script do algoritmo Microbeannotator consta no material
152 suplementar. O processo de busca em ambas as metodologias consistiu na pesquisa dos nomes das enzimas as
153 quais os genes são responsáveis pela codificação ou diretamente através da escrita *nod* mais a letra correspondente
154 ao gene, por exemplo *nodA* ou *nodB*. Para a anotação feita no RAST, as sequências da proteína sintetizada por
155 cada gene *nod* das 38 estirpes foram selecionadas para análises posteriores. Já a anotação dos genomas no
156 MicrobeAnnotator foi transferida para tabelas com a identificação dos genomas e os respectivos genes anotados
157 em cada um deles. Nestas tabelas, em uma determinada estirpe, o código de um gene foi pesquisado em outro
158 arquivo com os genomas traduzidos para proteínas através da plataforma Genemark
159 (<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>). Em ambas as metodologias as sequências proteicas encontradas foram
160 inseridas na plataforma BLAST (Basic Local Alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), opção
161 Blastp (proteína → proteína). O objetivo desse procedimento é identificar com quais sequências do banco de
162 dados do BLAST as sequências em estudo são idênticas e o quanto idênticas elas são (sequência em estudo e a
163 sequências do banco de dados). Além disso, ao entrar no código de acesso do gene do organismo mais próximo à
164 sequência em estudo, é possível confirmar na base de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) se a sequência
165 mais próxima encontrada é de fato do gene que se está procurando. Confirmando tais informações, a sequência do
166 gene foi selecionada para análise de filogenia. As sequências dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*,
167 *nodN* e *nodZ* das espécies descritas de *Bradyrhizobium* quando não encontradas no Banco de dados do NCBI
168 (National Center for Biotechnology Information) foram retiradas dos seus respectivos genomas. O código de
169 acesso dos genes e genomas constam na Tabela S1.

170

171 **Análise filogenética de genes nodulíferos**

172 Os diferentes tipos de genes responsáveis na nodulação como os gene *nod* estão envolvidos na codificação de
173 proteínas chaves no processo de fixação biológica de N₂. As sequências de cada um dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*,
174 *nodD1*, *nodI* e *nodJ*, *nodN*, *nodZ* das estirpes em estudo foram retiradas dos genomas e alinhadas junto das
175 sequências das estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas, usando o Muscle (EDGAR 2004).
176 Posteriormente as sequências foram cortadas e a árvores filogenéticas foram construídas utilizando o pacote do
177 programa MEGA 7 (KUMAR et al. 2016). A filogenia de cada um dos genes foi feita utilizando os métodos

178 estatísticos *neighbor joining* (NJ) (SAITOU and NEI 1987) e *maximum likelihood* (ML) (FELSENSTEIN 1981).
 179 Foi utilizado o bootstrap de 1000 nos dois métodos utilizados. O modelo de distância para todas as árvores
 180 construídas foi Tamura 3-parameter model (TAMURA 1992), exceto para a árvore do gene *nodN* cujo melhor
 181 modelo encontrado foi General Time Reversible (GTR) (NEI; KUMAR, 2000). As sequências dos genes *nodA*,
 182 *nodB*, *nodC*, *nodDI*, *nodI*, *nodJ*, *nodN* e *nodZ* foram avaliadas isoladamente. Todas as seqüências dos genes das
 183 estirpes em estudo foram retiradas dos seus genomas.

184

185 **Resultados e discussão**

186 **Filogenia dos genomas e matriz ANI (average nucleotide identity)**

187 Os genomas de *Bradyrhizobium* são considerados grandes (KUNDIG et al., 1993), pois podem chegar até
 188 13 Mpb . Em 180 genomas montados de estirpes de *Bradyrhizobium* observou-se que a maioria das estirpes
 189 apresentaram tamanhos de genomas entre 7 e 10 Mpb, com tamanho médio de 8,6 Mpb (ORMEÑO-
 190 ORRILLO; MARTÍNEZ-ROMERO 2019). Resultado semelhante foi encontrado nos genomas sequenciados das
 191 38 estirpes deste estudo (Tabela S1). O conteúdo de G + C encontrados em todos os genomas deste trabalho
 192 apresentaram valores entre 62 e 64% de G + C. Estes valores estão dentro da faixa encontradas para estirpes de
 193 *Bradyrhizobium* (KUYKENDALL et al. 1992; XU et al. 1995).

194 A partir da árvore filogenética construída com os 38 genomas sequenciados para este estudo mais as
 195 estirpes tipo de 60 espécies de *Bradyrhizobium*, observou-se a formação de clados bem separados com as estirpes
 196 em estudo que foram relacionados a suas espécies de origem ou hospedeiras. A seguir serão descritos o
 197 posicionamento das estirpes simbiotes de nódulos de *Arachis pintoi*, *Glycine max* L. e *Phaseolus lunatus* L.

198

199 **Estirpes simbiotes de *Arachis pintoi***

200 Dois clados foram formados pelas estirpes isoladas de nódulos de *Arachis pintoi* (Fig. 2). O primeiro
 201 deles é formado pelas estirpes UFLA05-98, UFLA05-129, UFLA05-108, UFLA05-111, UFLA05-89, UFLA05-
 202 112 e UFLA05-96 da Bahia mais a estirpe UFLA05-150 de Minas Gerais. Esse agrupamento mostrou uma
 203 ancestralidade comum com um *bootstrap* de 100%. O segundo agrupamento presente na árvore compreende as
 204 estirpes UFLA05-153, UFLA05-158 de Minas Gerais e as estirpes UFLA05-109, UFLA05-126, UFLA05-125 da
 205 Bahia. Os resultados do ANI entre as nove estirpes do primeiro clado formado foram iguais a 99-100% o que

206 indica que elas pertencem a mesma espécie. Além disso, os valores de ANI entre essas estirpes e as espécies já
 207 descritas foram inferiores a 93%, o que também indica que se trata de uma nova espécie de *Bradyrhizobium* (Fig.
 208 3). Do segundo agrupamento, dois subclados foram formados. Um deles pelas estirpes UFLA05-153 e UFLA05-
 209 158 e o outro pelas estirpes UFLA05-109, UFLA05-125 e UFLA05-126. Entre as estirpes UFLA05-153 e
 210 UFLA05-158 a média de identidade de nucleotídeos foi de 100%. Tal valor representa que as duas estirpes
 211 pertencem a uma mesma e nova espécie de *Bradyrhizobium*. No caso do outro clado, formado pelas três estirpes
 212 UFLA, o ANI encontrado foi de 99-100%. Outra nova espécie de *Bradyrhizobium* é formado por estas. Os
 213 resultados encontrados pela matriz do ANI indicam que todas as estirpes de amendoim forrageiro formam possíveis
 214 novas espécies. O grupo de estirpes que formam cada uma das espécies está descrito na Tabela 2.

215

216 **Estirpes simbiotes de *Glycine max* L.**

217 As estirpes provenientes de experimento em soja, UFLA06-12 e UFLA06-26, posicionaram-se
 218 separadamente das demais sequências genômicas presentes na árvore filogenética (Fig. 2). Um resultado bastante
 219 interessante foi que ambas as estirpes na matriz do ANI, agruparam-se com as estirpes pertencentes a espécie *B.*
 220 *brasilense*. As duas estirpes, UFLA06-12 e UFLA06-26 foram isoladas de nódulos de soja e são oriundas de
 221 diferentes regiões do Brasil, Minas Gerais e Piauí, respectivamente. A filogenia das estirpes UFLA06-07,
 222 UFLA06-03, UFLA06-11 de Minas Gerais e das estirpes UFLA06-28, UFLA06-29 do Piauí e UFLA06-42 de
 223 Santa Catarina agrupou-as em um grande clado com a estirpe tipo da espécie *B. elkanii* USDA76^T. O resultado da
 224 matriz de identidade de nucleotídeos reforça essa proximidade filogenética uma vez que o percentual entre todas
 225 as oito sequências genômicas foi superior a 98%, indicando que pertencem a espécie *B. elkanii*. A filogenia da
 226 estirpe UFLA06-24 do Piauí mostrou um posicionamento mais isolado das demais estirpes selecionadas da soja,
 227 posicionando-se mais proximamente a estirpe tipo da espécie *B. guangdongense* CCBAU 51619^T. Além disso, o
 228 ANI entre elas foi de 98% sugerindo que ambas pertencem a espécie *B. guangdongense* CCBAU 51649^T. As
 229 estirpes UFLA06-37 e UFLA06-40 do Mato Grosso do Sul formaram um pequeno clado com a espécie
 230 *B. japonicum* USDA 6^T. Esse agrupamento é consolidado pela identidade de nucleotídeos entre estas duas estirpes
 231 e *B. japonicum* USDA 6^T que foi de 97%, indicando que os três microrganismos pertencem a espécie de *B.*
 232 *japonicum* USDA 6^T. Dentro do grande clado da *B. elkanii* USDA 76^T as estirpes UFLA06-05 e UFLA06-06
 233 oriundas de Minas Gerais formaram um subclado separado das 7 estirpes isoladas de soja citadas acima. Estas

234 duas estirpes pertencem a uma nova espécie, pois o resultado do ANI de ambas comparado as demais estirpes tipo
 235 de espécies de *Bradyrhizobium* foi $\leq 96\%$ (Fig. 3).

236

237 **Estirpes simbiotes de *Phaseolus lunatus***

238 As estirpes UFLA03-144 e INPA237B do Amazonas, agruparam-se no mesmo grupo com um suporte
 239 estatístico de 100%; no mesmo clado que a estirpe tipo da espécie *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (Fig. 2). Semelhante
 240 ao resultado encontrado na filogenia, a matriz do ANI também agrupou as estirpes UFLA03-144 e INPA237B
 241 junto da espécie *B. viridifuturi* SEMIA 690^T com um percentual de similaridade entre as duas estirpes de feijão-
 242 fava de 99% (Fig. 3). As estirpes UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-221 e UFLA02-206 do Piauí formaram
 243 um clado separadamente das demais sequencias avaliadas com bootstrap de 100%. No entanto, a estirpe UFLA02-
 244 206 se posicionou em um subclado o que sugere alguma diferença evolutiva desta das outras três estirpes.
 245 Analisando o posicionamento na árvore filogenética, a espécie *B. pachyrhizi* PAC48^T mostrou diferença evolutiva,
 246 não se posicionando no mesmo clado, próxima a estas estirpes. No entanto, na matriz do ANI, estas estirpes
 247 (UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-221 e UFLA02-206) pertencem a espécie *B. pachyrhizi*, representada pela
 248 estirpe tipo PAC 48^T. com percentual de similaridade igual a 96%. As estirpes UFLA02-242, UFLA03-320 do
 249 Piauí e de Minas Gerais, respectivamente e a estirpe tipo da espécie *B. brasilense* UFLA03-321^T formaram um
 250 clado na árvore filogenética e estas duas últimas cepas formaram um subclado. Este subclado formado corrobora
 251 com o encontrado na descrição da espécie *B. brasilense* (COSTA et al. 2017) onde estas duas estirpes pertencem
 252 a esta mesma espécie de *Bradyrhizobium*. Comparado ao resultado encontrado na árvore filogenética, a matriz do
 253 ANI agrupou a estirpe UFLA03-320 com a espécie *B. brasilense* UFLA03-321^T com um percentual de identidade
 254 de 98%, reforçando os resultados encontrados pela descrição desta espécie. A estirpe UFLA02-242 se posicionou
 255 mais separadamente das duas estirpes de *B. brasilense* UFLA03-320 e UFLA03-321^T na árvore filogenética. Na
 256 matriz do ANI se posicionou próxima a espécie *B. pachyrhizi* PAC48^T ao invés da *B. brasilense* UFLA03-321^T
 257 (espécie posicionada no mesmo clado da estirpe UFLA02-242). As estirpes UFLA02-259, UFLA02-208 e
 258 UFLA02-213 formaram um clado com a espécie *B. zhanjiagense* CCBAU 51778^T. As estirpes UFLA02-208 e a
 259 UFLA02-213, no entanto, formaram um grupo separado de todas as estirpes inseridas na árvore, incluindo as
 260 espécies já descritas de *Bradyrhizobium*. No entanto, ao analisar o resultado da matriz do ANI, as estirpes
 261 UFLA02-213 e UFLA02-259 mostraram maior identidade de nucleotídeos com a espécie *B. zhanjiagense*
 262 CCBAU 51778^T visto que os percentuais de identidade entre esta espécie e as duas estirpes foram iguais ou

263 maiores a 96% (Fig. 2). As estirpes INPA86A e INPA54B^T pertencentes a espécie *B. forestalis* formaram um
 264 grupo separado das demais sequências de genomas incluídos na árvore filogenética com um *Bootstrap* de 100%,
 265 corroborando o resultado encontrado por da Costa et al. 2018. Além disso, a estirpe UFLA02-208 apresentou
 266 valores de ANI inferiores a 95% quando comparada com todas as estirpes de *Bradyrhizobium* descritas e das
 267 estirpes em estudo, indicando que ela é uma nova espécie.

268 Por fim, observou-se que das 38 estirpes estudadas selecionadas das três diferentes leguminosas
 269 (amendoim-forrageiro, soja e feijão-favas), as 13 estirpes de amendoim-forrageiro formaram novas espécies. Duas
 270 estirpes isoladas de nódulos de soja e uma estirpe de feijão-fava formaram duas novas espécies. Da primeira
 271 leguminosa a espécie nova foi formada por duas estirpes e da segunda leguminosa por apenas uma estirpe. As
 272 estirpes de soja que não formaram novas espécies pertencem às espécies já descritas *B. guangdongense*, *B.*
 273 *brasilense*, *B. elkanii* e *B. japonicum*. As estirpes de feijão-fava pertencem às espécies *B. pachyrhizi*, *B. viridifuturi*,
 274 e *B. zhanjiagense* (Tabela 2)

275

276 **Filogenia dos genes nodulíferos**

277 Os genes envolvidos na nodulação pesquisados nos genomas das 38 estirpes em estudo foram *nodA*,
 278 *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodE*, *nodF*, *nodI*, *nodJ*, *nodK*, *nodL*, *nodM*, *nodN*, *nodO*, *nodV*, *nodW* e *nodZ*. Não foram
 279 encontrados em nenhum dos genomas, os genes *nodE*, *nodF*, *nodK*, *nodL*, *nodM*, *nodO*, (Tabela 3). O gene *nodV*
 280 encontrado com algoritmo do Microbeannotator, somente foi encontrado nas estirpes de soja, exceto a UFLA06-
 281 24. O gene *nodW* não foi encontrado nas estirpes UFLA05-158, UFLA05-150, UFLA05-96 e UFLA05-108. A
 282 presença ou ausência dos genes *nod* nos organismos em estudo constam na Tabela 3.

283 De um modo geral a filogenias dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*, *nodN* e *nodZ* das 38
 284 estirpes selecionadas em amendoim forrageiro, feijão-fava e soja apresentaram agrupamentos muito semelhantes
 285 em todas as árvores construídas. Os organismos isolados de amendoim forrageiro formaram na maioria das
 286 filogenias dos genes analisados de dois a três cladogramas grandes que embora formem subclados entre os organismos
 287 agrupados, apresentaram três estirpes se posicionando mais separadamente das demais. O grupo de bactérias
 288 selecionadas a partir do feijão-fava mostrou posicionamentos mais diferenciados entre as estirpes nas árvores
 289 filogenéticas, formando maior número de agrupamentos entre elas. As estirpes provenientes da soja mostraram
 290 dois grupos bem definidos onde um deles é formado por 10 estirpes e o outro por três estirpes. Não houve a
 291 formação de subclados entre as estirpes, exceto nos genes *nodN* e *nodW* (Figuras S4 e S5). Os genes *nod* não

292 encontrados nas estirpes em estudo e nas estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas pode ter sido
293 devido ao processo de anotação utilizado. Não significa, necessariamente, a ausência desses genes nos genomas

294 As estirpes selecionadas de amendoim forrageiro apresentaram uma filogenia bastante semelhante nas
295 filogenias dos nove genes *nod* analisados, formando um grande clado composto pelas estirpes UFLA05-153,
296 UFLA05-158, UFLA05-125, UFLA05-126, UFLA05-109, UFLA05-112, UFLA05-96, UFLA05-111, UFLA05-
297 129, UFLA05-108, UFLA05-89, exceto para o gene *nodD1*. No entanto, entre elas, nos genes *nodA*, *nodC*, *nodN*,
298 estas estirpes dividiram-se em dois subclados. O primeiro deles é composto pelas cinco primeiras estirpes. O outro
299 subclado foi formado pelas outras 6 estirpes restantes (Figs. 4 e 6). Nos genes *nodB*, *nodI*, *nodJ* as estirpes se
300 diferenciaram em três subclados. Um deles é constituído pelas estirpes UFLA05-153 e UFLA05-158. O outro é
301 composto pelas estirpes UFLA05-125 e UFLA05-126. E o último deles pelos isolados UFLA05-112, UFLA05-
302 96, UFLA05-111, UFLA05-129, UFLA05-108 e UFLA05-89. Já as árvores filogenéticas dos genes *nodD1* e *nodZ*
303 exibiram um maior número de subclados entre os isolados do amendoim forrageiro. O gene *nodD1* subdividiu o
304 grande clado feito pelas 11 estirpes em 3 subclados bem distintos. O primeiro deles é composto pelas estirpes
305 UFLA05-153 e UFLA05-158. O segundo pelas estirpes UFLA05-125, UFLA05-126, UFLA05-112, UFLA05-96,
306 UFLA05-108 e UFLA05-98. E o terceiro pelos isolados UFLA05-109, UFLA05-111, UFLA05-129 e UFLA05-
307 89 (Fig. S1). O gene *nodZ* retrata um resultado bastante diferente dos demais genes *nod* com relação ao número
308 de subclados originados. Estirpes como a UFLA05-153, UFLA-05-125, UFLA05-126 e UFLA05-112
309 posicionaram-se isoladamente das demais estirpes. As estirpes UFLA05-111 e UFLA05-89 e as estirpes UFLA05-
310 129 e UFLA05-108 formaram pares (Fig. S5). A estirpe UFLA05-150 se posicionou separadamente dos demais
311 isolados de amendoim-forrageiro nos genes *nodA* e *nodD1*. Este isolado agrupou-se a estirpe UFLA05-98 nos
312 genes *nodB*, *nodC* (Figs. 5 e 6). Agrupou-se as demais estirpes do grande clado de amendoim forrageiro no gene
313 *nodN* e não foi encontrado nos genes *nodI*, *nodJ* e *nodZ*. A estirpe UFLA05-98 posicionou-se isoladamente nos
314 genes *nodI*, *nodJ* e *nodZ*. Nos genes *nodD1* e *nodN* posicionou-se junto do grande clado formado pelas demais
315 estirpes provenientes do amendoim forrageiro. A UFLA05-98 não foi inserida no gene *nodA* devido ao não
316 alinhamento da sua sequência às demais. A UFLA05-109 mostrou-se filogeneticamente distante das demais
317 estirpes de amendoim-forrageiro avaliadas nos genes *nodI*, *nodJ* e *nodZ*. No gene *nodW* as estirpes mostraram
318 resultados diferentes dos demais genes *nod* avaliados neste trabalho. As estirpes UFLA05-126, UFLA05-125 e
319 UFLA05-89 posicionaram isoladamente das demais estirpes do grupo do amendoim forrageiro e formaram clados
320 independentes e únicos (Fig. S5). Nos outros genes *nod* analisados elas formaram clados e subclados com estirpes
321 isoladas do amendoim forrageiro.

322 O primeiro grupo de estirpes isoladas de nódulos de soja é constituído pelas estirpes UFLA06-24,
323 UFLA06-37, UFLA06-40, exceto na filogenia do gene *nodN* cuja estirpe UFLA06-24 mostrou um posicionamento
324 distante das outras duas. O outro grupo é formado pelas estirpes UFLA06-12, UFLA06-29, UFLA06-07, UFLA06-
325 03, UFLA06-42, UFLA06-11, UFLA06-06, UFLA06-05, UFLA06-26 e UFLA06-28. A estirpe UFLA06-28 não
326 foi inserida na árvore do gene *nodB* em virtude do não alinhamento da sua sequência as demais sequências
327 analisadas (Fig. 5). A filogenia do gene *nodN* mostrou posicionamentos distintos, de algumas estirpes isoladas de
328 soja, das demais árvores filogenéticas construídas neste estudo. As estirpes UFLA06-12 e UFLA06-26 agruparam-
329 se separadamente das demais estirpes e dos clados os quais pertenciam nos outros genes (Fig. S4). No gene *nodW*
330 a estirpe UFLA06-24 também se posicionou separada das demais estirpes de soja (Fig. S5). Também foram
331 encontrados resultados distintos para as estirpes UFLA06-42 e UFLA06-05 no gene *nodW*. Ambas formaram
332 novos clados independente das demais estirpes isoladas de nódulos de soja.

333 Com relação a filogenia das estirpes selecionadas a partir do feijão-fava observou-se a formação de dois
334 clados em 6 dos 9 genes *nod* analisados. O primeiro deles é composto pelas estirpes INPA237B, UFLA03-320 e
335 UFLA03-144. A formação deste grupo poderia ser explicada pela origem das respectivas estirpes, pois as duas
336 primeiras foram isoladas originalmente da Amazônia, porém a estirpe UFLA03-320 foi isolada do estado de Minas
337 Gerais. Nos genes *nodJ* e *nodN*, a estirpe UFLA03-320 posicionou-se separadamente das outras duas estirpes do
338 mesmo grupo. O segundo grupo é formado pelas estirpes UFLA02-206, UFLA02-242, UFLA02-199, UFLA02-
339 195 e UFLA02-221. No gene *nodB*, a estirpe UFLA02-206 foi retirada pois a sequência estava muito menor que
340 as demais. Observou-se a formação de um clado composto pelas estirpes UFLA02-195, UFLA02-199 e UFLA02-
341 221 e UFLA02-242 (Figs. 5, S4, S5). As estirpes UFLA02-208 e INPA86A nos genes *nodA*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*
342 e *nodZ* agruparam-se num terceiro e mesmo clado dentro do grupo das estirpes selecionadas a partir do feijão-
343 fava. Embora próximas, estas duas estirpes não se agruparam no mesmo clado nos genes *nodB*, *nodJ* e *nodN*. Em
344 todos os genes *nod* avaliados as estirpes UFLA02-213, UFLA02-208 e UFLA02-259 se posicionaram
345 separadamente das demais estirpes selecionadas do feijão-fava.

346 Além disso, dentro deste agrupamento das 10 estirpes, as estirpes se subdividam em três pequenos grupos.
347 Um deles é composto pelas estirpes UFLA06-03 e UFLA06-42, o outro pelas estirpes UFLA06-05, UFLA06-06
348 e o último pelas estirpes UFLA06-28, UFLA06-29, UFLA06-07 e UFLA06-11 (Fig. S4).

349 Considerando os resultados obtidos a partir da filogenia dos genomas das 38 estirpes em estudo e das
350 análises filogenéticas obtidas através da construção das árvores dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*,
351 *nodN*, *nodZ* e *nodW*, observou-se que o posicionamento de das estirpes de feijão-fava se dispersaram ao longo da

352 árvore e o grupo formado pelas estirpes UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-221 e UFLA02-206 formaram um
353 clado como na árvore construída a partir dos genomas. Além disso, dois grupos das estirpes de amendoim
354 forrageiro como o grupo I: UFLA05-129, UFLA05-108, UFLA05-111, UFLA05-89, UFLA05-112, UFLA05-96
355 e o grupo II: UFLA05-153, UFLA05-158, UFLA05-109, UFLA05-126 e UFLA05-125 também foram observados
356 nas árvores dos genes *nod* e na filogenia a partir dos genomas. No caso da soja, o agrupamento foi semelhante
357 para as estirpes UFLA06-29, UFLA06-11, UFLA06-03, UFLA06-42 e para as estirpes UFLA06-05 e UFLA06-
358 06.

359 As estirpes isoladas de nódulos de amendoim forrageiro apresentaram um grande grupo formado pelas
360 estirpes UFLA05-153, UFLA05-158, UFLA05-125, UFLA05-126, UFLA05-112, UFLA05-96, UFLA05-111,
361 UFLA05-129, UFLA05-108 e UFLA05-89 na árvore dos genomas como encontrado nas árvores dos genes *nod*,
362 exceto para o para a estirpe UFLA05-98 que não foi inserida no gene *nodA* e se posicionou separadamente das
363 demais estirpes dos genes *nodB*, *nodC*, *nodD1* e para as estirpes UFLA05-109 e UFLA05-150 que quando
364 inseridas nas análises das árvores filogenéticas se posicionaram afastadas das demais estirpes isoladas do
365 amendoim. No entanto, na árvore filogenética dos genomas, estas três últimas estirpes se posicionaram no mesmo
366 grande clado que as demais estirpes isoladas de amendoim forrageiro. Subclados foram encontrados na filogenia
367 dos genomas e dos genes *nod* estudados, mas de um modo geral pode se dizer que em ambas as análises
368 filogenéticas as estirpes apresentaram posicionamentos de certa forma semelhantes quando seus genomas e genes
369 *nod* foram comparados, considerando a planta hospedeira como possivelmente responsável pelo agrupamento das
370 estirpes.

371 As estirpes isoladas de soja se posicionaram mais separadamente ao longo da árvore filogenética dos
372 genomas o que ocorreu de forma um pouco diferente nas árvores dos genes *nod* (Fig. 2; Fig.4- 6; Fig. S1-S4). As
373 estirpes que formavam um grupo na árvore dos genes *nod* (UFLA06-24, UFLA06-37 e UFLA06-40), exceto no
374 gene *nodN*, se posicionaram isoladamente e afastadas entre elas. No entanto, um resultado muito semelhante ao
375 encontrado nos genes *nod* avaliados, exceto o gene *nodW*, foi o posicionamento das estirpes UFLA06-05 e
376 UFLA06-06, que possivelmente pertencem a uma nova espécie, no mesmo clado na árvore dos genomas com um
377 101ootstrap de 100%. O grande clado formado pelas estirpes UFLA06-12, UFLA06-29, UFLA06-07, UFLA06-
378 03, UFLA06-42, UFLA06-11, UFLA06-06, UFLA06-05, UFLA06-26 e UFLA06-28 formado nos genes *nodA*,
379 *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*, *nodZ* foi dividido em subclados na árvore dos genomas, no entanto permaneceram
380 próximas as espécies *B. elkanii* USDA 76^T e *B. brasilense* UFLA03-321^T.

381 As estirpes isoladas de feijão-fava UFLA02-199, UFLA02-195, UFLA02-221 e UFLA02-206
382 apresentaram uma ancestralidade comum na árvore dos genomas e , as estirpes UFLA02-206 tanto na árvore
383 filogenética dos genomas e dos genes *nod*, exceto no gene *nodB* se posicionaram próximas, mas em clados
384 diferentes. A estirpe UFLA02-242 posicionou-se separadamente das estirpes acima citadas na árvore dos
385 genomas. Na filogenia dos genes nodulíferos avaliados esta estirpe se posicionou próxima as estirpes UFLA02-
386 199, UFLA02-195, UFLA02-221 e UFLA02-206. As estirpes INPA237B e UFLA03-144 mostraram resultados
387 muito semelhantes na árvore dos genomas e dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ*, *nodN*, *nodZ* e
388 *nodW*. A estirpe UFLA03-320 se posicionou bem separadamente das estirpes INPA237B e UFLA03-144 na árvore
389 dos genomas. Na árvore dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD1* e *nodI* estas três estirpes se posicionaram
390 proximamente. Vale ressaltar também que as estirpes capazes de nodular o feijão-fava mostraram posicionamentos
391 mais espalhados ao longo das árvores filogenéticas dos genes *nod* e dos genomas. Uma primeira hipótese como já
392 citado anteriormente, é que estas estirpes poderiam se agrupar em função de seus locais de origem. No entanto,
393 estirpes de diferentes localidades formaram um mesmo grupo em alguns dos genes *nod* avaliados, como as estirpes
394 UFLA03-320, INPA237A e UFLA03-144. Outra hipótese seria as diferentes plantas hospedeiras das quais as
395 estirpes foram isoladas. Mas, essas três últimas estirpes acima citadas foram isoladas de *Pterocarpus* sp. E feijão-
396 caupi, respectivamente o que não justificaria o agrupamento em função da planta hospedeira. No entanto,
397 considerando todas as estirpes capazes de nodular o feijão-fava, pode-se observar que apresentam maior
398 heterogeneidade em termos de local de origem e planta hospedeira quando comparadas com as estirpes da soja e
399 do amendoim forrageiro e por isso, apresentam uma distribuição mais espalhada nas árvores dos genes *nod* e dos
400 genomas. Estes posicionamentos podem estar atrelados a soma de dois fatores ao mesmo tempo; local de origem
401 e planta hospedeira que contribuíram ao longo do tempo para que estes organismos divergissem em termos
402 genéticos.

403

404 **Planta hospedeira x simbiote – Coevolução?**

405 Diversos modelos ao longo dos últimos anos têm sido propostos para explicar a simbiose entre rizóbios e
406 leguminosas. Dentre eles está o de coevolução. Este pode ser definido pela evolução conjunta de duas ou mais
407 espécies em resposta a uma pressão de seleção (FUTUYMA, 1998). No entanto, algumas características
408 ambientais e intrínsecas da planta hospedeira e do simbiote podem contribuir, alternativamente ou
409 adicionalmente, para que essa interação leguminosas-rizóbios seja mutualmente benéfica.

410 A fim de entender essa relação coevolutiva, alguns estudos tem avaliado a filogenia de plantas hospedeiras
411 e seus simbioses. O trabalho realizado por Suonemen et al. (2001) observou que a filogenia de genes *nod* parece
412 seguir a filogenia de leguminosas. A filogenia do gene *nodA* e ITS e das leguminosas em estudo (*Glycine max*,
413 *Phaseolus vulgaris* e *Arachis major*) foram congruentes. Outros trabalhos mostraram que a coevolução pode ser
414 refletida pelas filogenias congruentes e paralelas entre o hospedeiro e do endossimbionte bacteriano.

415 Comparando os resultados obtidos neste estudo a partir dos nove genes *nod* obtidos dos genomas das 38
416 estirpes selecionadas do amendoim, feijão-fava e soja, de modo geral, as estirpes agruparam-se em função de suas
417 plantas hospedeiras indicando históricos evolutivos independentes entre si. Essa diferenciação também foi
418 encontrada na árvore filogenética do gene *matk* das espécies *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* (mesmo gênero de
419 *Phaseolus lunatus*) e *Arachis hypogaea* (mesmo gênero de *Arachis pintoi*) subfamília Papilionoideae (AZANI et
420 al. 2017) que formaram clados independentes, mostrando históricos evolutivos bastante distintos.

421 O gênero *Arachis*, mais especificamente, a espécie *Arachis hypogaea*, é capaz de formar nódulos
422 radiculares nas raízes com rizóbios de crescimento lento (ZHANG et al., 1999; YANG et al., 2005) que pertencem
423 ao gênero *Bradyrhizobium* (TAURIAN et al. 2006). Nos últimos anos, diversas espécies destes microrganismos,
424 capazes de formar nódulos efetivos nas raízes dessa leguminosas, têm sido descritas: *B. lablabi*, *B. arachidis*, *B.*
425 *guangdongense*, *B. guangxiense*, *B. nanningense*, *B. guangzhouense*, *B. zhanjiangense* (CHANG et al. 2011;
426 WANG et al. 2012; LI et al. 2015; LI et al. 2019). Identificação de espécies em *Arachis pintoi* com bases em seu
427 genoma não é relatada na literatura. Estirpes de *Bradyrhizobium* capazes de nodular e fixar nitrogênio em *A. pintoi*
428 foram identificadas por de Sá et al. 2019 baseando-se no sequenciamento do 16SrRNA. Neste trabalho, todas as
429 estirpes isoladas de *A. pintoi* representaram novas espécies.

430 Com relação ao gênero *Glycine*, destaca-se de forma considerável a espécie *Glycine max* L. visto que
431 está entre as três culturas mais importantes do mundo (SHAMSELDIN & VELÁZQUEZ, 2020), como as espécies
432 *Arachis hypogaea* e *Phaseolus vulgaris* L. A relação simbiótica desta leguminosas com estirpes de
433 *Bradyrhizobium* é tão bem-sucedida que diversas espécies pertencentes a este gênero têm sido utilizadas como
434 inoculantes na cultura da soja (COSTA et al. 2020). Atualmente, existem 13 espécies de *Bradyrhizobium* descritas
435 que foram isoladas de soja . Dentre estas espécies, oito são capazes de formar nódulos ativos e fixar
436 biologicamente o N₂, considerando suas estirpes tipo: *B. daqingense* CCBAU15774^T, *B. elkanii* USDA 76^T, *B.*
437 *huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T, *B. japonicum* USDA 6^T, *B. liaoningense* LMG 18230^T, *B. ottawaense* OO99^T,

438 *B.diazoeficiens* USDA 110^T, *B. diversitatis* CNPSo 4019^T. Neste trabalho também foi identificada uma nova
439 espécie de *Bradyrhizobium* isolada de soja que apresentou baixa eficiência em realizar a FBN.

440 Leguminosas hospedeiras pertencentes ao gênero *Phaseolus* podem estabelecer simbiose com
441 microrganismos de gêneros bem diferentes. A espécie *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum) por exemplo, é em
442 todo mundo, nodulada pela maioria das espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* e por poucas espécies de
443 *Bradyrhizobium*, geralmente ineficientemente (SHAMSIELD & VELÁZQUEZ, 2020). No entanto, em *Phaseolus*
444 *lunatus* diversas espécies do gênero *Bradyrhizobium* são capazes de formar nódulos e serem eficientes nesta
445 leguminosa (DURÁN et al. 2014; RODRIGUES et al. 2021) e são os principais simbioses fixadores de nitrogênio
446 (ORMEÑO-ORRILLO et al. 2006; LÓPEZ-LOPÉZ et al. 2013; RODRIGUES et al. 2021). Atualmente existem
447 duas espécies descritas de *Bradyrhizobium* isoladas de feijão-fava, *B. icense* e *B. paxllaeri* (DURÁN et al. 2014).
448 No presente estudo, foi identificada uma nova espécie de *Bradyrhizobium* isolada de feijão-fava.

449 Embora a relação entre leguminosas e simbioses tenha se iniciado e sido estabelecida há milhões de anos
450 atrás, tem sido debatido como a história evolutiva entre estes organismos vem ocorrendo durante todo este tempo.
451 Discute-se que essa relação simbiótica estaria sob influência somente da coevolução ou, alternativamente, outros
452 mecanismos têm sido utilizados pela planta hospedeira e/ou pelo microssimbionte. Um dos mecanismos já
453 discutido seria a seleção da bactéria pela planta hospedeira. Das bactérias existentes no solo, a planta seleciona
454 determinadas estirpes para a formação de nódulos (MNASRI et al. 2007; RANGIN et al. 2008). Ela controla o
455 destino dos bacteróides (MARÓTI and KONDOROSI, 2014). Um exemplo interessante onde leguminosas
456 selecionaram de forma rápida bactérias simbióticas é o caso de árvores noduladas, nas Filipinas, por
457 microrganismos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* que foram introduzidos na região, sendo essas novas
458 bactérias as responsáveis pela nodulação destas árvores (ANDAM E PARKER, 2008). Tal situação também
459 poderia estar ocorrendo com as 38 estirpes deste estudo. Contrariamente a um processo de coevolução estar
460 ocorrendo, as três leguminosas desse estudo podem estar selecionando seus parceiros simbióticos no processo de
461 fixação biológica de N₂ uma vez que as estirpes capazes de nodular cada uma das leguminosas (amendoim
462 forrageiro, feijão-fava e soja) não se agruparam em função dos locais de onde foram isoladas.

463 Dentre as características intrínsecas dos microssimbioses que podem ser considerados alternativos à
464 coevolução estão a utilização de genes específicos para a formação de nódulos nas plantas e posterior fixação de
465 N₂ em leguminosas. A presença da proteína produzida pelo gene *nodD* faz com que a planta selecione as bactérias
466 com afinidade aos flavonóides produzido por elas (MARTÍNEZ-ROMERO 2009). O gene *nodD1*, encontrado nas
467 38 estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas para este trabalho, funciona como um ativador transcricional positivo

468 e responde aos flavonóides produzidos pelas plantas hospedeiras (KOSSLAK et al. 1987; BANFALVI et al. 1988;
469 GÖTTFERT et al. 1990). Outra característica seria a presença de polissacarídeos bacterianos que são críticos na
470 infecção do hospedeiro (PEIX et al. 2015). Sua ausência pode levar a baixa capacidade de nodulação e em certos
471 casos, alterações na gama de hospedeiros (GRAY e ROLFE, 1990; DAZZO , 1991; GIBSON, 2008). Os genes
472 específicos de biossíntese de polissacarídeos na superfície dos microrganismos simbióticos são *eps*, *kps*, *lps*, *ndv*
473 (FRAYSSE et al. 2003; DOWNIE et al. 2010).

474 A transferência horizontal de genes simbióticos é frequente na natureza (LEMAIRE et al. 2015; PÉREZ
475 et al. 2016). Sua importância na transmissão de habilidades simbióticas entre bactérias tem sido reconhecida
476 (ROGEL et al., 2001; BAILLY et al., 2007; MARTÍNEZ-ROMERO 2009). A transferência horizontal pode
477 ocorrer via plasmídeo ou ilhas simbióticas, como no caso do gênero *Bradyrhizobium*. A transmissão horizontal de
478 genes pode ocorrer entre gêneros e espécies diferentes de microrganismos. Estudo recente concluiu que a
479 similaridade do gene *nod* observada entre certas espécies de *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia* sugerem a
480 provável transferência horizontal de genes simbióticos e que os simbiontes da classe Alfa-Proteobacterias realizam
481 mudança de hospedeiros ao longo do processo evolutivo (RAHIMLOU et al. 2021).

482 Genes como *nod* e *nif* que previamente não pertenciam ao DNA genômico de determinados gêneros e
483 espécies de bactérias, por exemplo, ao longo da evolução, foram adquiridos por esses organismos para que fossem
484 capazes de fixar N₂ e sobreviver. Trabalhos tem mostrado que bactérias de solos se tornaram simbiontes em
485 leguminosas, na natureza, através da aquisição de genes lateralmente de ilhas simbióticas de genomas
486 (SULLIVAN et al. 1995; SULLIVAN et al. 1998). O sucesso desse mecanismo é aumentado pela forte seleção
487 que a planta hospedeira exerce a fim de que ocorra a eficiência da infecção, a nodulação e aptidão de erros na
488 ação da DNA polimerase que aceleram a simbiose após a transferência de genes (REMIGI et al. 2016). Rizóbios
489 possuem genomas plásticos e instáveis devido as recombinações que ocorrem em seus genomas e a transferência
490 horizontal de genes é a principal fonte de diversidade genética. Em *Bradyrhizobium*, a alta plasticidade das ilhas
491 simbióticas promove, incidentalmente, a seleção de variantes adaptadas (ZHAO et al. 2018). Embora não seja
492 possível identificar como os genes *nod* foram transferidos nas 38 estirpes em estudo pertencentes ao gênero
493 *Bradyrhizobium*, acredita-se que possivelmente, pode ter sido pela transferência horizontal de genes que não só é
494 um processo natural como também ocorre muito facilmente no grupo dos rizóbios.

495 As estirpes UFLA02-213 e UFLA02-259 apresentaram nas filogenias dos genes *nod* um posicionamento
496 isolado e separado das demais estirpes do seu respectivo grupo. Isto talvez possa ser explicado pela obtenção

497 desses genes, pelas duas estirpes, a partir da transferência horizontal de genes de um ancestral diferente das demais
498 estirpes do grupo o qual pertencem e/ ou ao longo do tempo seus genes *nod* tornaram-se menos específicos à planta
499 hospedeira já que as estirpes UFLA02-213 e UFLA02-259 posicionaram-se isoladamente dos outros 10
500 organismos selecionados de feijão-fava. As mesmas hipóteses levantadas acima podem ser estendidas às estirpes
501 UFLA05-98 e UFLA05-150 do amendoim forrageiro que também se posicionaram separadamente das demais em
502 alguns genes *nod*.

503

504 **Conclusão**

505 As análises filogenéticas dos genomas das 38 estirpes de *Bradyrhizobium* com a maioria das estirpes tipo
506 das espécies já descritas de *Bradyrhizobium* mostraram de modo geral resultados muito similares a matriz do ANI
507 o que indica que ambas as análises podem ser utilizadas para identificar espécies ou diferenciar novos isolados de
508 organismos previamente descritos.

509 Diferentes espécies de *Bradyrhizobium* são capazes de formar simbiose com as 3 leguminosas em estudo.
510 Os simbiossitos de amendoim forrageiro foram identificados como novas espécies dentro do gênero
511 *Bradyrhizobium*. Não há espécies descritas dentro do gênero *Bradyrhizobium* isoladas dessa leguminosa. Dentre
512 os simbiossitos oriundos da soja foram identificadas 8 espécies já descritas de *Bradyrhizobium*, das quais 5 são
513 simbiossitos de soja (*B. guangdongense*, *B. brasilense*, *B. elkanii* e *B. japonicum* e *B. brasilense*). Além disso
514 também foi encontrada uma nova espécie nesse grupo de estirpes formado pelas estirpes UFLA06-05 e UFLA06-
515 06. No feijão-fava, as espécies já descritas encontradas foram *B. pachyrhizi*, *B. viridifuturi*, *B. zhanjiagense* e uma
516 nova espécie formada pela estirpe UFLA02-208. Verificou-se a presença de diferentes genes *nod* como *nodA*,
517 *nodB*, *nodC*, *nodD1*, *nodI*, *nodJ* e *nodN*, *nodW*, *nodZ* nos 38 genomas selecionados a partir de estirpes simbiossitos
518 de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava. Não foram encontrados os genes *nodE*, *nodF*, *nodK*, *nodL*, *nodM*,
519 *nodO*, *nodV* em todas as estirpes estudadas. Dessa forma, observou-se que a presença ou ausência dos 16 genes
520 *nod* avaliados não diferiu em função das origens das estirpes nem de suas respectivas plantas hospedeiras.

521 A árvore filogenética construída com os 38 genomas e filogenias dos genes *nod* mostraram
522 posicionamentos semelhantes de estirpes simbiossitos das três leguminosas estudadas. Alguns grupos foram
523 consistentes na árvore do genoma e nos 9 genes *nod* avaliados. Os grupos formados nas árvores filogenéticas dos
524 genes *nod*, aparentemente, ocorreram em função de suas plantas hospedeiras.

525

526 **Agradecimentos.** Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil
 527 (CAPES) (CAPES/PROEX/PPGCS - 593-18) para a realização desse trabalho, ao Conselho Nacional de
 528 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo: 431504/2016-4) e a Fundação de Amparo e
 529 Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (CAG – RED – 00330-16) pela concessão da bolsa, financiamento de análises
 530 e equipamentos utilizados.

531

532 Referências

533 Andam, CP, & Parker, MA (2008). Origins of Bradyrhizobium nodule symbionts from two legume trees in the
 534 Philippines. *Journal of biogeography*, 35:1030-1039. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01844.x>

535 Arkin, AP., Cottingham, RW., Henry, CS, et al. (2018). KBase: the United States department of energy systems
 536 biology knowledgebase. *Nat. Biotechnol.*, 36:566-569. <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>

537 Azani, N., Babineau, M., Bailey, CD., Banks, H., Barbosa, AR., Pinto, RB., ... & Zimmerman, E. (2017). A new
 538 subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The
 539 Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *taxon*, 66:44-77.

540 Aziz RK, Bartels D, Best A, et al (2008) The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC*
 541 *Genomics* 9:1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>

542 Baev, Nedelcho; Kondorosi, Adam. (1992) Nucleotide sequence of the *Rhizobium meliloti nodL* gene located in
 543 locus n5 of the nod regulon. *Plant Mol Biol*, 8:843-846. <https://doi.org/10.1007/bf00020033>

544

545 Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A., Schell, M., Besl, L., & Stacey, G. (1988). Regulation of nod gene expression in
 546 *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular and General Genetics* MGG, 214:420-
 547 424. <https://doi.org/10.1007/bf00330475>

548

549 Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications
 550 to single-cell sequencing. *J. Comput*, 19:455-477.

551

552 Bailly, X., Olivieri, I., Brunel, B., Cleyet-Marel, JC, & Béna, G. (2007). Horizontal gene transfer and homologous
 553 recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J.*
 554 *Bacteriol.*, 189:5223-5236.

555 Bibb, M J, Biro, S., Motamedi, H., Collins, JF, & Hutchinson, CR (1989). Analysis of the nucleotide sequence of
 556 the *Streptomyces glaucescens tcmI* genes provides key information about the enzymology of polyketide
 557 antibiotic biosynthesis. *The EMBO Journal*, 8272:7-2736. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08414.x>

558

559 Bloemberg, GV., Kamst, E., Harteveld, ., et al. (1995). A central domain of *Rhizobium* NodE protein mediates
 560 host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors. *Mol*
 561 *Microbiol.*, 16:1123-1136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02337.x>

562 Bromfield, ES, & Cloutier, S. (2021). *Bradyrhizobium septentrionale* sp. nov.(sv. septentrionale) and
 563 *Bradyrhizobium quebecense* sp. nov.(sv. septentrionale) associated with legumes native to Canada possess
 564 rearranged symbiosis genes and numerous insertion sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 71.
 565 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004831>

566 Cárdenas, L., Dominguez, J., Santana, O., & Quinto, C. (1996). The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport
 567 of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene*, 173:183-187. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00166-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00166-7)

568

- 569 Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic
570 analysis. *Mol. Biol. Evol.*, 17:540-552.<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
571
- 572 Chang, YL, Wang, JY, Wang, ET, Liu, HC, Sui, XH., & Chen, WX. (2010). *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov.,
573 isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea* grown in Southern China. *Int J*
574 *Syst Evol Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/ijs.0.027110-0>
575
- 576 da Costa, E.M., de Almeida Ribeiro, PR, de Lima, W., Palhares Farias, T., & de Souza Moreira, FM (2017). Lima
577 bean nodulates efficiently with *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume
578 species. *Symbiosis*, 73:125-133. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0473-8>
579
- 580 da Costa, EM, Guimarães, AA, Soares de Carvalho, T., Louzada Rodrigues, T., de Almeida Ribeiro, P. R., Lebbe,
581 L., ... & de Souza Moreira, F. M. (2018). *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing
582 bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Arch Microbiol*, 200:743-752.
583 <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1486-2>
584
- 585 da Costa, EM, Almeida Ribeiro, PR, Soares de Carvalho, T. et al. (2020). Efficient nitrogen-fixing bacteria isolated
586 from soybean nodules in the semi-arid region of Northeast Brazil are classified as *Bradyrhizobium brasiliense*
587 (symbiovar sojae). *Current Microbiology*, 77:1746-1755.
588
- 589 da Silva, K., De Meyer, S. E., Rouws, L. (2014). *Bradyrhizobium ingae* sp. nov., isolated from effective nodules
590 of *Inga laurina* grown in Cerrado soil. *Int. J. Syst. Evol Microbiol*, 64:3395-3401.
- 591 Dazzo, FB, Truchet, GL., Hollingsworth, R. I., et al. (1991). *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection
592 thread development in white clover root hairs. *J. B.*, 173:5371-5384. [https://doi.org/10.1128/jb.173.17.5371-](https://doi.org/10.1128/jb.173.17.5371-5384.1991)
593 [5384.1991](https://doi.org/10.1128/jb.173.17.5371-5384.1991)
- 594 Debelle, F., Plazanet, C., Roche, P., et al. (1996). The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici*
595 specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.*, 22:303-314.
596 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00069.x>
- 597 Delamuta, JR.M., Ribeiro, A., Ormeño-Orrillo, E., Parma, MM., Melo, IS., Martínez-Romero, E., & Hungria, M.
598 (2015). *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing
599 symbionts of tropical forage legumes. *Int. J. Syst. Evol Microbiol*, 65:4424-4433.
- 600 Delamuta, JRM., Ribeiro, RA., Araújo, JL., et al. (2016). *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising
601 nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int. J. Syst.*
602 *Evol Microbiol*, 66:3078-3087.
- 603 Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, et al. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in
604 soil. *Science*, 359:320-325. <https://doi.org/10.1126/science.aap9516>
- 605 de Matos, GF, Zilli, JE, de Araújo, J., et al. (2017). *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating
606 bacterium isolated from sugarcane roots. *Arch. Microbiol.*, 199:1251-1258.
- 607 Demont, N., Debelle, F., Aurelle, H., Denarié, J., & Promé, J. C. (1993). Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and
608 *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. *J. Biol. Chem.*, 268:20134-20142.
- 609 Downie, J. A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia
610 with legume roots. *FEMS microbiology reviews*, 34:150-170.
- 611 Duran, D., Rey, L., Mayo, J., et al. (2014). *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov.,
612 nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int. J Systematic Evol*
613 *Microbiol.* , 64: 2072-2078.<https://doi.org/10.1099/ijs.0.060426-0>
- 614 Economou, A., Hamilton, WD, Johnston, AW., & Downie, JA (1990). The *Rhizobium* nodulation gene *nodO*
615 encodes a Ca²⁺-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to
616 haemolysin and related proteins. *The EMBO journal*, 9:349-354. [https://doi.org/10.1002/j.1460-](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08117.x)
617 [2075.1990.tb08117.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08117.x)

- 618 Edgar, RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids*
619 *research*, 32:1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- 620 Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol*
621 *Evol*, 17:368-376. <https://doi.org/10.1007/bf01734359>
- 622 Ferguson, BJ., Mens, C., Hastwell, AH., et al. (2019). Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell*
623 *Environ*, 42:41-51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- 624 Fernández-López, M., d'Haese, W., Mergaert, P., Verplancke, C., Prome, JC., Van Montagu, M., & Holsters, M.
625 (1996). Role of *nodI* and *nodJ* in lipo-chitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and
626 *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 20:993-1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365->
627 [2958.1996.tb02540.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02540.x)
- 628
- 629 Fraysse, N., Couderc, F., & Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–
630 legume symbiosis. *Eur. J biochem*, 270:1365-1380. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03492.x>
- 631
- 632 Futuyma, D.J. *Evolutionary Biology* (Sinauer Associates, Sunderland, MA), 1998.
- 633
- 634 Geremia, RA., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M., & Holsters, M. (1994). The *NodC* protein of
635 *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of*
636 *Sciences*, 91:2669-2673. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2669>
- 637
- 638 Gibson, KE, Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic
639 infection. *Annual review of genetics*, 42, 413. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>
- 640
- 641 Gnat, S., Małek, W., Oleńska, E., Wdowiak-Wróbel, S., Kalita, M., Łotocka, B., & Wójcik, M. (2015). Phylogeny
642 of symbiotic genes and the symbiotic properties of rhizobia specific to *Astragalus glycyphyllos* L. *PLoS*
643 *One*, 10(10), e0141504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141504>
- 644
- 645 Göttfert, M., Hitz, S., & Hennecke, H. (1990). Identification of *nodS* and *nodU*, two inducible genes inserted
646 between the *Bradyrhizobium japonicum* *nodYABC* and *nodIJ* genes. *Mol Plant Microbe Interact*, 3:308-316.
647 <https://doi.org/10.1094/mpmi-3-308>
- 648
- 649 Gray, JX, & Rolfe, BG (1990). Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Molecular*
650 *microbiology*, 4:1425-1431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02052.x>
- 651
- 652 Guimarães, AA, Duque Jaramillo, PM, Simão Abrahão Nóbrega, R., Florentino, L. A., Barroso Silva, K., & de
653 Souza Moreira, F. M. (2012). Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from
654 agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Appl. Environ.*
655 *Microbiol*, 78:6726-6733. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>
- 656
- 657 Guimaraes, AA, Florentino, LA, Almeida, KA, Lebbe, L., Silva, K. B., Willems, A., & de Souza Moreira, F. M.
658 (2015). High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in
659 Brazilian tropical ecosystems. *Syst Appl Microbiol*, 38:433-441.
660 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006> <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>
- 661
- 662 Helene, LCF, Delamuta, JRM., Ribeiro, RA, Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Martínez-Romero, E., & Hungria,
663 M. (2015). *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used
664 for green manure and environmental services. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65:4441-4448.
- 665
- 666 Helene, LCF, Delamuta, JRM., Ribeiro, R. A., & Hungria, M. (2017). *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a
667 nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int J Syst*
668 *Evol Microbiol*, 67:1827-1834.
- 669
- 670 John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., & Schell, J. (1993). *Rhizobium NodB* protein involved in
671 nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:625-
672 629. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.625>
- 673

- 674 Kanehara, K., & Minamisawa, K. (2017). Complete genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* J5, isolated
675 from a soybean nodule in Hokkaido, Japan. *Genome Announc.*, 5(6), e01619-16.
676 <https://doi.org/10.1128/genomea.01619-16>
677
- 678 Kaneko, T., Maita, H., Hirakawa, H., Uchiike, N., Minamisawa, K., Watanabe, A., & Sato, S. (2011). Complete
679 genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6^T. *Genes*, 2:763-787.
680 <https://doi.org/10.3390/genes2040763>
681
- 682 Konstantinidis, KT, & Tiedje, JM (2005). Genomic insights that advance the species definition for
683 prokaryotes. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.*, 102:2567-2572. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409727102>
684
- 685 Kosslak, RM, Bookland, R., Barkei, J., Paaren, HE, & Appelbaum, ER (1987). Induction of *Bradyrhizobium*
686 *japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proceedings of the National*
687 *Academy of Sciences*, 84:7428-7432. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7428>
- 688 Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for
689 bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33:1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- 690 Kündig, C., Hennecke, H. A. U. K. E., & Göttfert, M. (1993). Correlated physical and genetic map of the
691 *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. *J. Bacteriol.*, 175:613-622. [https://doi.org/10.1128/jb.175.3.613-](https://doi.org/10.1128/jb.175.3.613-622.1993)
692 [622.1993](https://doi.org/10.1128/jb.175.3.613-622.1993)
- 693 Kuykendall, LD, Saxena, B., Devine, TE, & Udell, S. E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum*
694 Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol.*, 38:501-505.
695 <https://doi.org/10.1139/m92-082>
- 696 Lemaire, B., Dlodlo, O., Chimphango, S., et al. (2015). Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia
697 in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). *FEMS Microbiol*, 91:2-17.
698 <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu024>
699
- 700 Li, YH., Wang, R., Zhang, XX, Young, JPW., Wang, ET., Sui, XH., & Chen, WX. (2015). *Bradyrhizobium*
701 *guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium guangxiense* sp. nov., isolated from effective nodules of
702 peanut. *Int J Syst. Evol Microbiol*, 65:4655-4661. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000629>
703
- 704 López-Lara, IM., van den Berg, JD, Thomas-Oates, JE, Glushka, J., Lugtenberg, B. J., & Spaink, H. P. (1995).
705 Structural identification of the iipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Mol.*
706 *Microbiol*, 15(4), 627-638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02372.x>
- 707 MacLean, A. M., Finan, T. M., & Sadowsky, M. J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of
708 legumes. *Plant Physiol.*, 144:615-622. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101634>
- 709 Martínez-Romero, E. (2009). Coevolution in Rhizobium-legume symbiosis?. *DNA Cell Biol.*, 28:361-370.
710 <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0863>
711
- 712 Maróti, G., & Kondorosi, É. (2014). Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host
713 peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front. Microbiol.*, 5, 326.
714 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00326>
715
- 716 Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes:
717 how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.*, 17:458-466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>
718
- 719 Mergaert, P., d'Haeze, W., Fernández-López, M., et al. (1996). Fucosylation and arabinosylation of nod factors in
720 *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *nodK*, *nodZ* as well as *noeC* and/or downstream genes. *Molecular*
721 *microbiology*, 21:409-419. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6451366.x>
722
- 723 Michel, DC, Passos, SR, Simões-Araujo, JL, et al. (2017). *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium*
724 *macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. *Arch.*
725 *Microbiol.*, 199:657-664.3
726
- 727 Michel, DC, Guimarães, AA, da Costa, EM et al. (2020). *Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient
728 cowpea symbiont. *Arch. of Microbiol.*, 202:1135-1141.
729

- 730 Michel, DC, da Costa, EM, Guimarães, AA, Soares de Carvalho, et al. (2021). *Bradyrhizobium campsiandrae* sp.
731 nov., a nitrogen-fixing bacterial strain isolated from a native leguminous tree from the Amazon adapted to
732 flooded conditions. Arch. Microbiol., 203:233-240.
733
- 734 Moreira, F. M., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., & Franco, A. A. (1993). Characterization of rhizobia isolated from
735 different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of
736 their total proteins. Syst. Appl Microbiol., 16:135-146.
737
- 738 Moreira, FMS.; Siqueira, JO (2006) Microbiologia e Bioquímica do solo. 2. ed. Lavras: UFLA.
739
- 740 Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2007). Salt-tolerant rhizobia isolated from a
741 Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel
742 biovar (bv. mediterranense) of *Sinorhizobium meliloti*. Arch. Microbiol., 187:79-85.
743 <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0173-x>
744
- 745 Nei, M., & Kumar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, USA.
746
- 747 Ormeno-Orrillo, E., Vinuesa, P., Zuniga-Davila, D., & Martínez-Romero, E. (2006). Molecular diversity of native
748 bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. Systematic and applied
749 microbiology, 29:253-262. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.002>
750
- 751 Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E (2019) A Genomotaxonomy View of the Bradyrhizobium Genus. Front
752 Microbiol 10:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01334>
- 753 Parker MA (2015) The Spread of Bradyrhizobium Lineages Across Host Legume Clades : from Abarema to Zygia.
754 Microbiol. Ecol. 630–640. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0503-5>
- 755 Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, et al (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered
756 from. Genome Res. Cold Spring Harbor Laboratory Press Method 1:1–31.
757 <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- 758 Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ (2015) Bacterial Associations with Legumes. CRC Crit
759 Rev Plant Sci 34:17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
- 760
- 761 Pérez Carrascal OM, VanInsberghe D, Juárez S, et al (2016) Population genomics of the symbiotic plasmids of
762 sympatric nitrogen-fixing Rhizobium species associated with *Phaseolus vulgaris*. Environ Microbiol
763 18:2660–2676. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13415>
- 764 Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. Microbiology and
765 Molecular Biology Reviews 64:180–201. <https://doi.org/10.1128/membr.64.1.180-201.2000>
- 766 Price, MN, Dehal, PS, & Arkin, AP (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large
767 alignments. PloS one, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
768
- 769 Rahimlou S, Bahram M, Tedersoo L (2021) Phylogenomics reveals the evolution of root nodulating alpha- and.
770 Microbiol Res 250:126788. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126788>
- 771 Rangin, C., Brunel, B., Cleyet-Marel, JC, Perrineau, MM, & Béna, G. (2008). Effects of *Medicago truncatula*
772 genetic diversity, rhizobial competition, and strain effectiveness on the diversity of a natural *Sinorhizobium*
773 species community. Appl. Env. Microbiol, 74:5653-5661.
774
- 775 Rejili M, Off K, Brachmann A, Marín M (2020) *Bradyrhizobium hipponense* sp. nov., isolated from lupinus
776 angustifolius growing in the northern region of tunisia. Int J Syst Evol Microbiol 70:5539–5550.
777 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004445>
- 778 Remigi P, Zhu J, Young JPW, Masson-Boivin C (2016) Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing
779 Legume Symbionts. Trends Microbiol 24:63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>

- 780 Ribeiro, PA, dos Santos, JV, da Costa, EM et al. (2015). Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean
781 bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agric Ecosyst & Environ*, 212: 85-93.
782 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.017>
783
- 784 Rodrigues, TL, da Costa, EM, Ribeiro, PA et al. (2021). Diversity and biotechnological potential of rhizobia
785 isolated from 1 ma bean nodules collected at a semiarid region. *Soil Science Society of America*
786 *Journal*, 85:1663-1678.
787
- 788 Rogel, MA, Hernández-Lucas, I., Kuykendall, LD, Balkwill, DL, & Martinez-Romero, E. (2001). Nitrogen-fixing
789 nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl Environ*
790 *Microbiol*, 67:3264-3268. <https://doi.org/10.1128/aem.67.7.3264-3268.2001>
791
- 792 Rufini M, de Pádua Oliveira D, Trochmann A, et al (2014) Estirpes de Bradyrhizobium em simbiose com guandu-
793 anão em casa de vegetação e no campo. *Pesqui Agropecu Bras* 49:197–206. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000300006>
794
- 795 Ruiz-Perez CA, Conrad RE, Konstantinidis KT (2021) MicrobeAnnotator: a user-friendly, comprehensive
796 functional annotation pipeline for microbial genomes. *BMC Bioinformatics* 22:1–16.
797 <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03940-5>
- 798 de Sá, OAA, de Almeida Ribeiro, PR, Rufini, M., de Freitas Cruvinel, IA, Casagrande, DR, & de Souza Moreira,
799 F. M. (2019). Microsymbionts of forage peanut under different soil and climate conditions belong to a
800 specific group of Bradyrhizobium strains. *Applied Soil Ecology*, 143, 201-212.
801 <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.07.018>
- 802 Saitou N, Nei M The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees' *Mol*
803 *Biol Evol* 4:406–425, 1987 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- 804 Sanjuan et al 1992 A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of
805 *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 89:8789-8793.
806 <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8789>
- 807 Shamseldin A, Velázquez E (2020) The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation
808 with rhizobia : a review. *World J Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>
- 809 Shearman CA, Rossen L, Johnston AWB, Downiel JA (1986) The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene
810 nodF encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root
811 exudate. *The EMBO journal*, 5:647-652. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04262.x>
- 812 Silva F v., de Meyer SE, Simões-Araújo JL, et al (2014) *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from
813 effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazonian rainforest soils. *Int J Syst Evol*
814 *Microbiol* 64:2358–2363. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.061259-0>
- 815 Spaink HP, H Okker RJ, Wijffelman -carel A, et al (1989) Symbiotic Properties of Rhizobia Containing a
816 Flavonoid-Independent Hybrid nodD Product *Journal of bacteriology*, 171:4045-4053.
- 817 Stacey G, Luka S, Sanjuan J, et al (1994) nodZ, a Unique Host-Specific Nodulation Gene, Is Involved in the
818 Fucosylation of the Lipooligosaccharide Nodulation Signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*,
819 v:620-633, 1994. <https://doi.org/10.1128/jb.176.3.620-633.1994>
- 820 Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, et al (1995) strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal
821 symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92:8985–8989
- 822 Sullivan JT, Ronson CW (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates
823 into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* v. 95:5145-5149. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5145>
- 824 Sutton JM, Leat EJA, Downie JA (1994) The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium*
825 *leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes (nodule/hemolysin/lipid blayer/pore). *Proc*
826 *Natl Acad Sci U.S.A.* v:9990-9994. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9990>

- 827 Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned
828 blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56:564–577.
829 <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- 830 Tamura K Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-
831 Transversion and G+C-Content Biases. *Mol Biol Evol* 9:678–687.
832 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
833
- 834 Taurian T, Ibañez F, Fabra A, Aguilar OM (2006) Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L.
835 in central Argentinean soils. *Plant Soil* 282:41–52. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-5314-5>
- 836 Teulet A, Gully D, Rouy Z, et al (2020) Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of NOD and T3SS
837 genes in the genus *bradyrhizobium*. *Microb Genom* 6:1–18. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000407>
- 838 Tian CF, Zhou YJ, Zhang YM, et al (2012) Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests
839 extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8629–8634.
840 <https://doi.org/10.1073/pnas.1120436109>
- 841 Wang R, Chang YL, Zheng WT, et al (2013) *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules
842 of *Arachis hypogaea* grown in China. *Syst Appl Microbiol* 36:101–105.
843 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.009>
- 844 Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., & Fan, H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root
845 nodules of soybeans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 45: 706-711.
846
- 847 Yang JK, Xie FL, Zou J, et al (2005) Polyphasic characteristics of *bradyrhizobia* isolated from nodules of peanut
848 (*Arachis hypogaea*) in China. *Soil Biol Biochem* 37:141–153. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.06.016>
- 849 Zhang X, Nick G, Kaijalainen S, et al (1999) Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the
850 root nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in Sichuan, China. *Syst Appl Microbiol* 22:378–386.
851 [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80046-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80046-0)
- 852 Zhao R, Liu LX, Zhang YZ, et al (2018) Adaptive evolution of rhizobial symbiotic compatibility mediated by co-
853 evolved insertion sequences. *ISME Journal* 12:101–111. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.136>
- 854 Zilli JE, Baraúna AC, da Silva K, et al (2014) *Bradyrhizobium neotropiale* sp. nov., isolated from effective
855 nodules of *Centrolobium paraense*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3950–3957.
856 <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065458-0>
- 857
858
- 859
- 860
- 861
- 862
- 863

Legenda das figuras

Fig 1 Mapa dos locais de onde as 38 estirpes foram isoladas. São eles: Santa Catarina, Minas Gerais, Bahia, Piauí e Amazônia. Autor: Teotonio S. de Carvalho

Fig. 2 Filogenia baseada no genoma das 38 estirpes simbiotes de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava. O modelo estatístico foi o *maximum likelihood*. As estirpes em vermelho são simbiotes da soja; azul do amendoim forrageiro e verde do feijão-fava.

Fig. 3 Matriz reduzida do ANI com as 38 estirpes mais as estirpes tipo de espécies de *Bradyrhizobium* já descritas mais próxima

Fig 4 Filogenia do gene *nodA* (234 pb) através do método estatístico *maximum-likelihood* mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (36). Valores de *bootstrap* superiores a 50% são indicados nos nós. O código de acesso dos genomas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde.

Fig 5 Filogenia do gene *nodB* (618 pb) através do método estatístico *maximum-likelihood* mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies do gênero *Bradyrhizobium* já descritas (39). Valores de *bootstrap* superiores a 50% são indicados nos nós. O código de acesso dos genomas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde.

Fig. 6 Filogenia do gene *nodC* (381 pb) através do método estatístico *maximum-likelihood* mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (45). Valores de *bootstrap* superiores a 50% são indicados nos nós. O código de acesso dos genomas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde.

Tabela 1. Código das estirpes, espécie vegetal e local (estado brasileiro) de onde as estirpes foram isoladas, referências dos organismos em estudo e as coordenadas geográficas de cada estirpe

Código das estirpes	Planta hospedeira – experimento de eficiência	Isolamento original das estirpes	Referências	Coordenadas geográficas
UFLA05-112	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-111	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-98	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-153	<i>Arachis pintoi</i>	Minas Gerais	SÁ et al. (2019)	21° 14' S; 44° 58' O
UFLA05-158	<i>Arachis pintoi</i>	Minas Gerais	SÁ et al. (2019)	21° 14' S; 44° 58' O
UFLA05-126	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-150	<i>Arachis pintoi</i>	Minas Gerais	SÁ et al. (2019)	21° 14' S; 44° 58' O
UFLA05-96	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-109	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-129	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-108	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-89	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-125	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al. (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA06-24	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al. (2015)	9_190210'S; 44_480550' O
UFLA06-12	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al. (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-28	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al. (2015)	9_190210'S; 44_480550' O
UFLA06-29	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al. (2015)	9_190210'S; 44_480550' O
UFLA06-07	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al. (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-03	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al. (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-42	<i>Glycine max</i> L.	Santa Catarina	RIBEIRO et al. (2015)	27_29013''S; 51_24058'' O
UFLA06-11	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al. (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-06	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al. (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-40	<i>Glycine max</i> L.	Mato Grosso do Sul	RIBEIRO et al. (2015)	22_13056''S; 54_59025'' O
UFLA06-05	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al. (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-37	<i>Glycine max</i> L.	Mato Grosso do Sul	RIBEIRO et al. (2015)	22_13056''S; 54_59025'' O
UFLA06-26	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al. (2015)	9_190210'S; 44_480550' O
UFLA02-195	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18'' S; 44°945.10'' O
UFLA02-199	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18'' S; 44°945.10''

UFLA02-206	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10"
UFLA02-221	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10"
UFLA 03-144	<i>Vigna unguiculata L.</i>	Amazônia	GUIMARÃES et al. (2012)	4°21' a 4°26' S; 69°36 a 70°1' O
INPA 86A	<i>Swarzia sp</i>	Amazônia	MOREIRA et al., (1993)	-
UFLA02-242	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
UFLA02-208	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
UFLA02-213	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
UFLA02-259	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al. (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
INPA237B	<i>Pterocarpus sp.</i>	Amazônia	GUIMARÃES et al. (2015)	-
UFLA03-320	<i>Vigna unguiculata</i>	Minas Gerais	RUFINI et al. (2014)	21°20'S; 45°00' O

Tabela 2. Identificação (comparação de genoma através da matriz do ANI) das estirpes simbiotes de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava

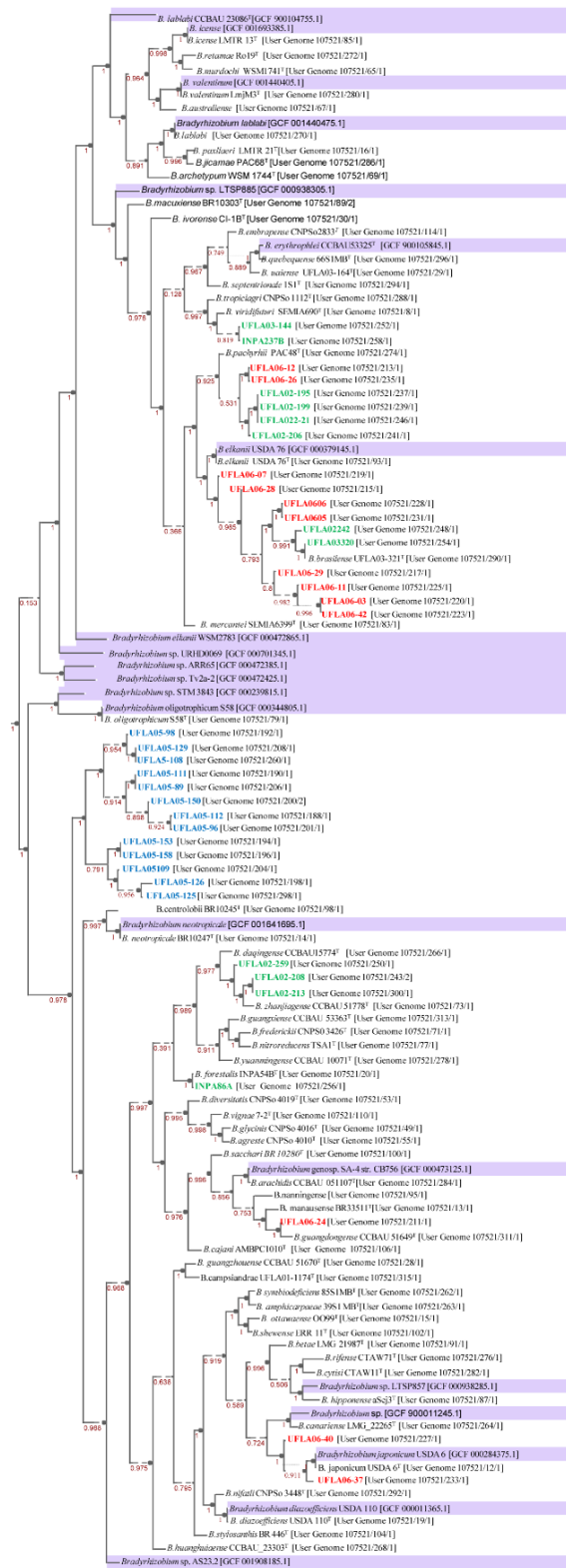
Amendoim forrageiro	Soja	Feijão-fava
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-98	<i>B. guangdongense</i> UFLA 06-24	<i>B. pachyrhizi</i> UFLA 02-206
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-150	<i>B. brasilense</i> UFLA 06-12	<i>B. pachyrhizi</i> UFLA02-221
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-96	<i>B. elkanii</i> UFLA 06-28	<i>B. pachyrhizi</i> UFLA02-242
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-129	<i>B. elkanii</i> UFLA 06-29	<i>B. pachyrhizi</i> UFLA02-195
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-108	<i>B. elkanii</i> UFLA 06-07	<i>B. pachyrhizi</i> UFLA02-199
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-89	<i>B. elkanii</i> UFLA 06-03	<i>B. viridifuturi</i> UFLA03-144
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-112	<i>B. elkanii</i> UFLA 06-11	<i>B. viridifuturi</i> I237B
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 1 UFLA05-111	<i>B. elkanii</i> UFLA 06-42	<i>B. forestalis</i> INPA86A
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 2 UFLA05-153	<i>B. sp. nov. 4</i> UFLA 06-05	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nov 5 UFLA02-208
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 2 UFLA05-158	<i>B. sp. nov. 4</i> UFLA 06-06	<i>B. brasilense</i> UFLA03-320
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 3 UFLA05-125	<i>B. japonicum</i> UFLA 06-40	<i>B. zhanjiagense</i> UFLA02-213
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 3 UFLA05-109	<i>B. japonicum</i> UFLA 06-37	<i>B. zhanjiagense</i> UFLA02-259
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Nov 3 UFLA05-126	<i>B. brasilense</i> UFLA06-26	

Tabela 3. Presença e ausência dos genes *nod* nas 38 estirpes simbiotes de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava

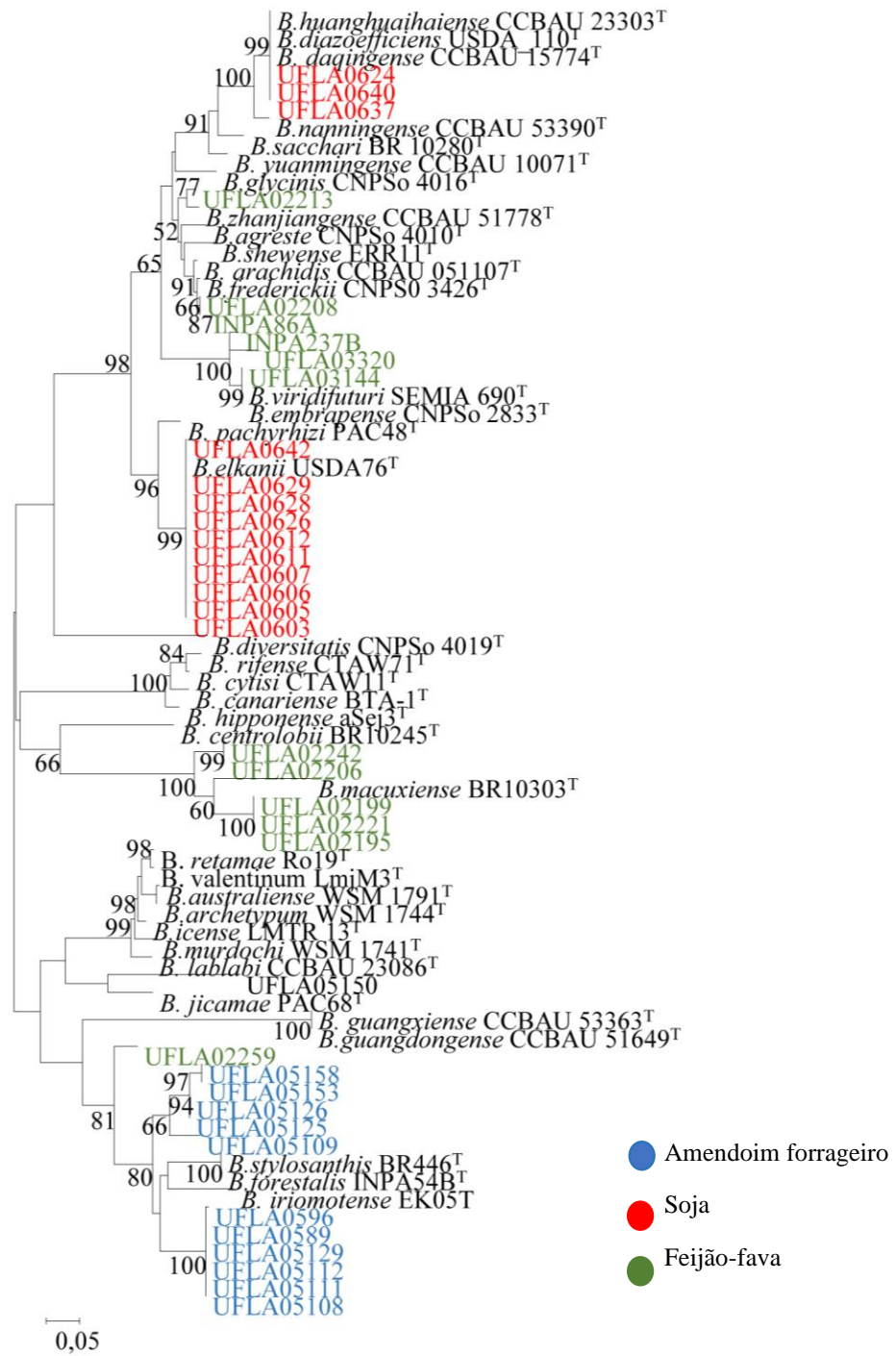
Estirpes	<i>nodA</i>	<i>nodB</i>	<i>nodC</i>	<i>nodD1</i>	<i>nodE</i>	<i>nodF</i>	<i>nodI</i>	<i>nodJ</i>	<i>nodK</i>	<i>nodL</i>	<i>nodN</i>	<i>nodM</i>	<i>nodO</i>	<i>nodV</i>	<i>nodW</i>	<i>nodZ</i>
UFLA05-112	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-111	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-98	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-153	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-158	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
UFLA05-126	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-150	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UFLA05-96	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
UFLA05-109	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-129	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-108	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
UFLA05-89	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA05-125	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-195	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-199	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-206	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-221	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA03-144	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
INPA86A	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-242	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-208	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-213	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA02-259	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
INPA237B	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA03-320	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
UFLA06-24	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+

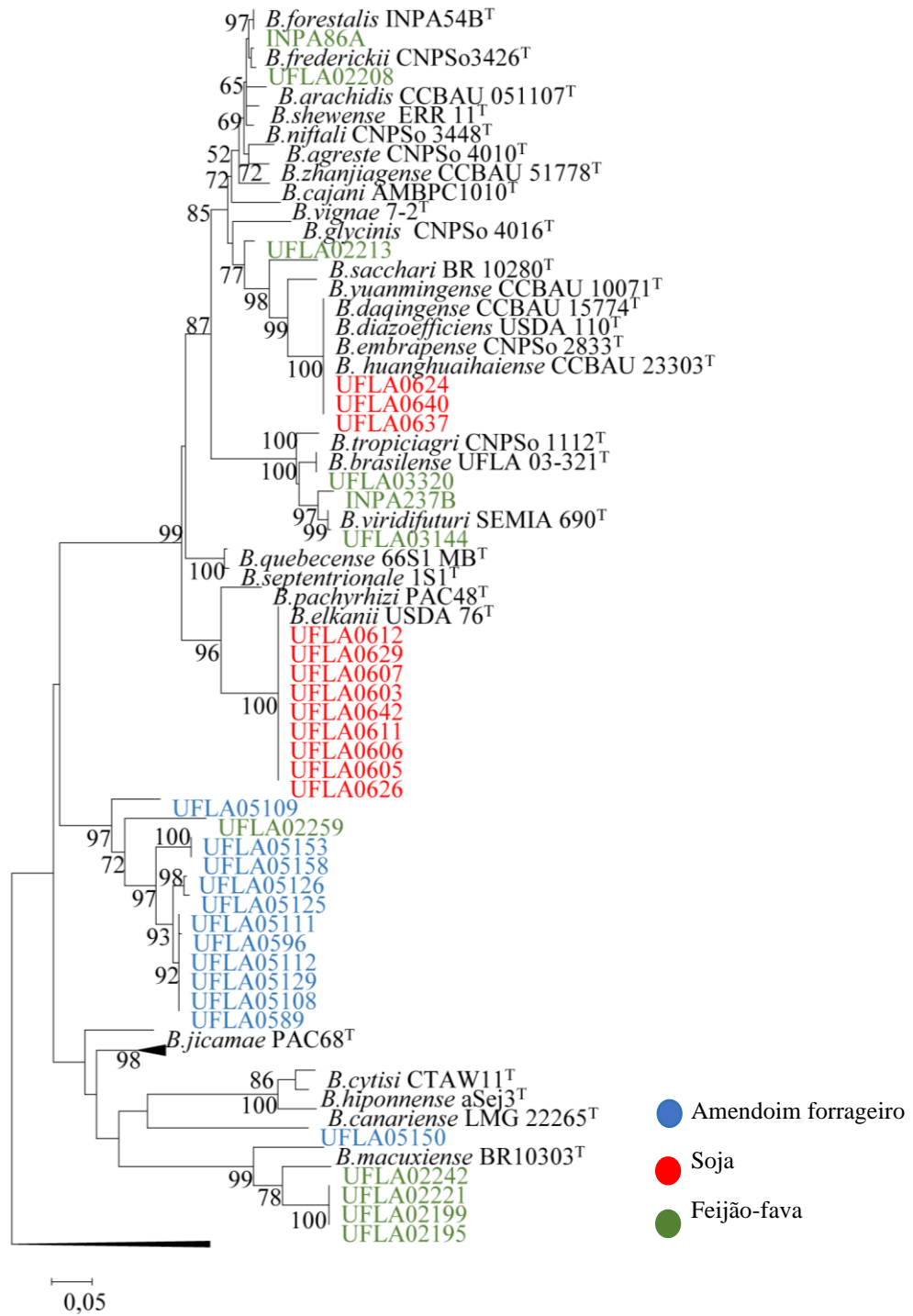
UFLA06-12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-28	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-29	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-07	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-03	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-42	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-11	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-06	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-40	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-05	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-37	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
UFLA06-26	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+

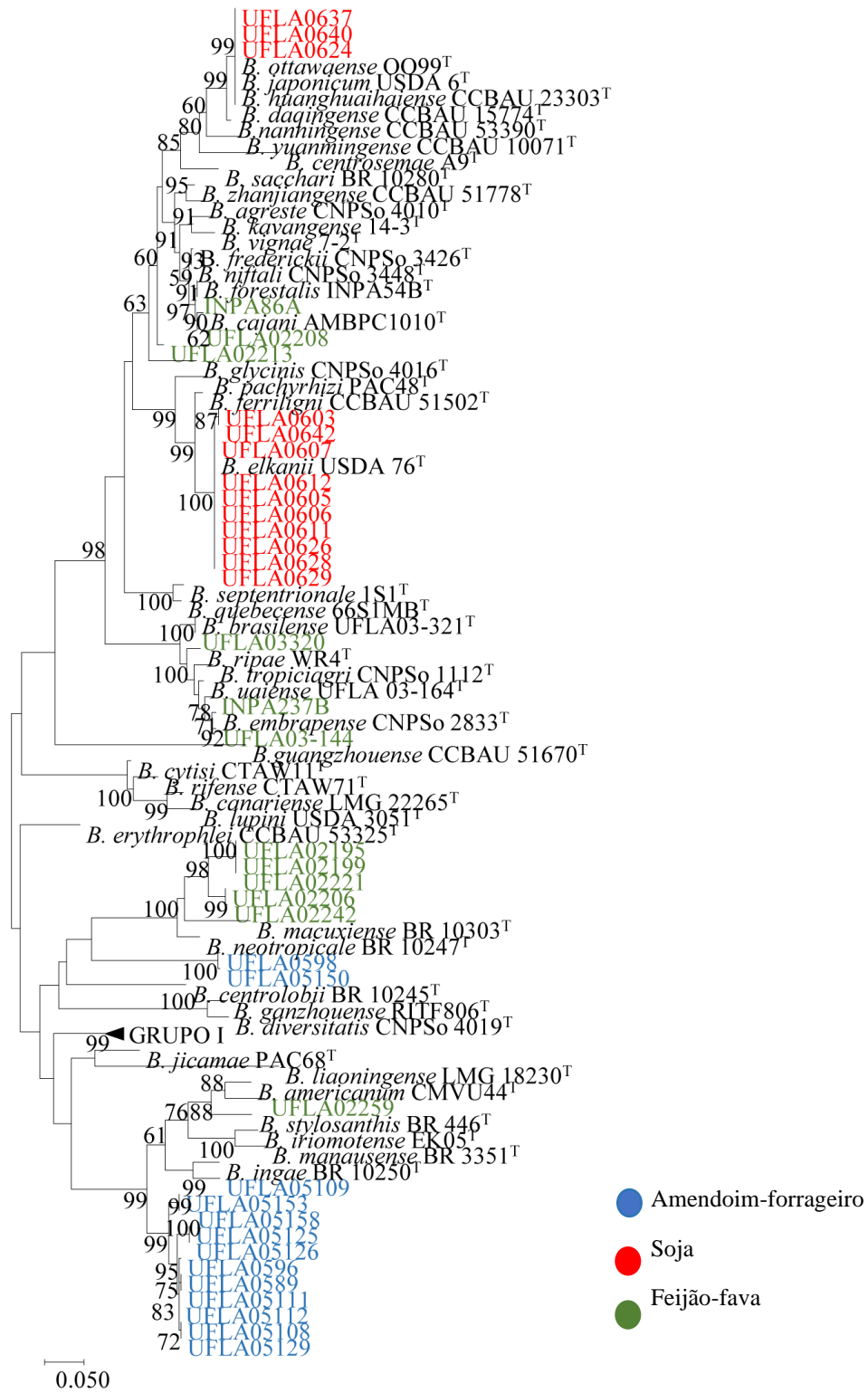




- Amendoin-forrageiro
- Soja
- Feijão-fava







Supplementary material

Genômica comparativa e estudo evolutivo de genes *nod* anotados em 38 estirpes de *Bradyrhizobium* simbiotes de *Arachis pintoi*, *Phaseolus lunatus* L. e *Glycine max* L.

Daniele Cabral Michel, Teotonio Soares de Carvalho, Konstantinos T. Konstantinidis, Fatima Maria de Souza Moreira*

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mailaddress: fmoreira@ufla.br (F.M. de Souza Moreira).

Tabela S1. Características gerais dos 38 genomas sequenciados

	UFLA 05-112	UFLA 05-111	UFLA 05-98	UFLA 05-153	UFLA 05-158	UFLA 05-126	UFLA 05-150	UFLA 05-96
Contigs (≥ 0 pb)	238	316	324	368	361	230	238	354
Total length (≥ 1000 pb)	8977705	9719871	9766970	1072354 7	1072356 4	10123433	9542331	9494769
N50	81658	60345	67861	66076	69886	89888	93679	59362
N75	45383	38541	40 297	35423	39238	50506	51162	30729
L50	35	49	44	46	46	36	33	48
L75	71	98	90	100	96	73	68	101
GC (%)	62.66	62.46	62.48	62.42	62.42	62.4	62.55	62.53
Mismatches								
N's	295	195	96	690	784	394	289	199
N's per 100 kpb	3.29	2.01	0.98	6.43	7.31	3.89	3.03	2.1
Predicted genes								
predicted genes (unique)	8985	9815	9928	11029	11027	10321	9663	9675
	UFLA 05-109	UFLA 05-129	UFLA 05-108	UFLA 05-89	UFLA 05-125	UFLA 02-195	UFLA 02-199	UFLA 02-206
Contigs (≥ 0 pb)	180	266	289	312	198	165	272	213
Total length	9541292	9562735	9611833	9710548	9695220	8759050	8765604	8646645
N50	112545	76439	106170	66187	103721	107905	57388	68857
N75	57473	49833	58710	39193	50166	52391	30967	40985
L50	30	41	31	45	27	27	41	38
L75	60	80	61	94	60	57	92	77
GC (%)	62.53	62.55	62.54	62.45	62.46	63.79	63.78	63.92
Mismatches								
N's	485	97	206	292	487	580	581	194
N's per 100 kbp	5.08	1.01	2.14	3.01	5.02	6.62	6.63	2.24
Predicted genes								
predicted genes (unique)	9476	9718	9777	9803	9704	8574	8633	8515

	UFLA 02-221	UFLA 03-144	INPA 86A	UFLA 02-242	UFLA 02-208	UFLA 02-213	UFLA 02-259	INPA 237B
Contigs (≥ 0 pb)	123	138	213	232	193	202	281	185
Total length	8759861	8874167	8229081	8962068	9384135	8644982	9157684	8896116
N50	140049	184391	94777	73101	99070	109727	64062	173050
N75	79982	91639	54920	40299	56206	52706	36586	94492
L50	17	14	25	38	30	27	42	17
L75	37	32	55	80	63	56	89	33
GC (%)	63.79	63.99	63.84	63.72	63.75	63.06	63.04	63.97
Mismatches								
N's	587	588	197	785	490	191	389	491
N's per 100 kbp	6.7	6.63	2.39	8.76	5.22	2.21	4.25	5.52
Predicted genes								
predicted genes (unique)	8565	8781	8022	8853	9047	8726	9147	8696
	UFLA 03-320	UFLA 06-24	UFLA 06-12	UFLA 06-28	UFLA 06-29	UFLA 06-07	UFLA 06-03	UFLA 06-42
Contigs (≥ 0 pb)	258	226	229	220	367	243	317	252
Total length	8958457	8081863	9040783	9834790	9791018	9631213	9569775	9566644
N50	66307	113292	77093	112622	61955	91300	60647	84205
N75	38330	47700	38821	65365	37453	50349	32314	44026
L50	37	22	37	27	47	34	50	39
L75	80	50	77	55	98	70	106	79
GC (%)	63.72	63.20	63.78	63.64	63.57	63.69	63.71	63.69
Mismatches								
N's	297	195	578	490	489	488	496	487
N's per 100 kbp	3.32	2.41	6.39	4.98	4.99	5.07	5.18	5.09
Predicted genes								
predicted genes (unique)	8845	8084	8967	9830	9816	9571	9551	9493

Tabela S2. Número de acesso dos genomas das estirpes tipo de *Bradyrhizobium* de onde os genes *nod* foram extraídos.

Estirpes	<i>nodA</i>	<i>nodB</i>	<i>nodC</i>	<i>nodD1</i>	<i>nodI</i>	<i>nodJ</i>	<i>nodN</i>
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	NZ_LGTB00000000.1	NZ_LGTB00000000.1	NZ_LGTB00000000.1	NZ_LGTB00000000.1	-	-	NZ_LGTB00000000.1
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	KC509196.1	NZ_CP030050.1	KF962705	NZ_CP030050.1	-	-	NZ_CP030050.1
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	MN905127.1	VSST00000000.1	AJ560653	VSST00000000.1	-	-	VSST00000000.1
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	LM994609.1	NZ_VSSR00000000.1	EU597844	NZ_VSSR00000000.1	-	-	NZ_VSSR00000000.1
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	KC509194.1	NZ_VLKL00000000.1	HQ231326	NZ_VLKL00000000.1	-	-	NZ_VLKL00000000.1
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	ARAG00000000.1	ARAG00000000.1	AB354631	ARAG00000000.1	-	-	ARAG00000000.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	NZ_VLLA00000000.1	NZ_VLLA00000000.1	KF472814	NZ_VLLA00000000.1	NZ_VLLA00000000.1	NZ_VLLA00000000.1	NZ_VLLA00000000.1
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	NZ_CP016428.1	NZ_CP016428.1	KF896159	NZ_CP016428.1	-	NZ_CP016428.1	NZ_CP016428.1
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	-	-	KF927054	-	-	-	-
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	LM994612.1	-	AB301000	-	-	-	-
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	-	-	AP012206	-	NC_017249.1	-	-
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	LM994617.1	LLXZ00000000.1	AB573869	-	-	LLXZ00000000.1	LLXZ00000000.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	LM994615.1	LLYB00000000.1	GU433565	LLYB00000000.1	-	LLYB00000000.1	LLYB00000000.1
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	-	-	GU263466	-	-	-	-
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	-	-	KF786002.1	-	LJYG00000000.1	-	-
<i>B. neotropicae</i> BR 10247 ^T	-	-	KJ661727	-	LSEF00000000.1	-	-
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	-	-	-	NC_020453.1	-	-	NC_020453.1
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	-	-	HQ587980	-	NZ_CP029425.1	-	-
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	LM994616.1	-	AB573868	-	LFIQ00000000.1	LFIQ00000000.1	LFIQ00000000.1
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	-	-	KF896160	-	NZ_CP042968.1	-	-
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	KF806459.1	LLYA00000000.1	KC247112	LLYA00000000.1	-	LLYA00000000.1	LLYA00000000.1
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	LM994610.1	VSSS00000000.1	EU597853	VSSS00000000.1	-	VSSS00000000.1	-
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	KC509193.1	FMAE00000000.1	AB354633.1	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2	KP234521	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	KC509176.1	NZ_CP030051.1	-	NZ_CP030051.1	-	-	NZ_CP030051.1
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	KC509186.1	ASM411491v1	-	-	-	-	ASM411491v1
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	-	-	KT033402	-	-	-	-

<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	JX518540.2	LLXX00000000.1	JX514897	LLXX00000000.1	-	LLXX00000000.1	LLXX00000000.1
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	NZ_RDQF00000000.1	NZ_RDQF00000000.1	KT362339	NZ_RDQF00000000.1	NZ_RDQF00000000.1	NZ_RDQF00000000.1	NZ_RDQF00000000.1
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	-	-	MH182918.1	-	-	-	-
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	KF114576	-	-	-	-	-	-
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	-	-	KJ818109	-	-	-	-
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	HQ259481.1	LFLZ00000000.1	KP234520	LFLZ00000000.1	LFLZ00000000.1	LFLZ00000000.1	LFLZ00000000.1
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	-	-	-	NZ_MKFI00000000.1	-	-	NZ_MKFI00000000.1
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	PGVG00000000	PGVG00000000	KT793177.1	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000
<i>B. americanum</i> CMVU 44 ^T	-	-	KC247130	-	-	-	-
<i>B. cajani</i> AMBPC 1010 ^T	WQNE00000000.1	WQNE00000000.1	KY349444	WQNE00000000.1	WQNE00000000.1	WQNE00000000.1	WQNE00000000.1
<i>B. centrosemae</i> A9 ^T	-	-	KC247134	-	-	-	-
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	LVEM00000000.1	-	KU724160.1	LVEM00000000.1	-	LVEM00000000.1	LVEM00000000.1
<i>B. lupini</i> USDA 3051 ^T	-	-	KM114864	-	-	-	-
<i>B. shewense</i> ERR11 ^T	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	-	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1
<i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T	NZ_LWIG00000000.1	NZ_LWIG00000000.1	KF196792	NZ_LWIG00000000.1	NZ_LWIG00000000.1	NZ_LWIG00000000.1	NZ_LWIG00000000.1
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	NZ_LUUB00000000.1	NZ_LUUB00000000.1	KX527941.1	NZ_LUUB00000000.1	-	NZ_LUUB00000000.1	NZ_LUUB00000000.1
<i>B. brasilense</i> UFLA 03-321 ^T	MPVQ00000000	MPVQ00000000	KT793173	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	NZ_LNCU00000000.1	NZ_LNCU00000000.1	KX527945	NZ_LNCU00000000.1	-	NZ_LNCU00000000.1	NZ_LNCU00000000.1
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	-	-	KX661399.1	-	-	-	-
<i>B. ripae</i> WR4 ^T	-	-	MF593106	-	-	-	-
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	-	-	FJ348666.1	-	-	-	-
<i>B. frederickii</i> CNPSo 3426 ^T	SPQS00000000	SPQS00000000	MK682743.1	SPQS00000000	-	SPQS00000000	SPQS00000000
<i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T	LBJC00000000	LBJC00000000	LBJC00000000	LBJC00000000	LBJC00000000	LBJC00000000	LBJC00000000
<i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T	-	-	NZ_CP030053.1	-	NZ_CP030053.1	-	-
<i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1
<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T	-	-	-	-	-	-	NZ_CP029427.1
<i>B. amphicarpace</i> 39S1 MB ^T	-	-	-	-	-	-	NZ_CP029426.1
<i>B. uaiense</i> UFLA03-164 ^T	-	-	NZ_VKHP00000000.1	-	NZ_VKHP00000000.1	NZ_VKHP00000000.1	-
<i>B. ivorensense</i> CI-1B ^T	-	-	CAADFC00000000.2	-	CAADFC00000000.2	-	-

<i>B. niftali</i> CNPSo 3448 ^T	NZ_SPQT00000000.1	NZ_SPQT00000000.1	-	NZ_SPQT00000000.1	NZ_SPQT00000000.1	NZ_SPQT00000000.1	NZ_SPQT00000000.1
<i>B. campsiandrae</i> UFLA01-1174 ^T	-	-	-	-	-	-	JAANIH00000000.1
<i>B. archetypum</i> WSM 1744 ^T	JAAVLW000000000	JAAVLW000000000	MK893251	JAAVLW000000000	-	JAAVLW000000000	JAAVLW000000000
<i>B. australiense</i> WSM 1791 ^T	JAAVLX000000000	JAAVLX000000000	MK893253	JAAVLX000000000	-	JAAVLX000000000	JAAVLX000000000
<i>B. murdochi</i> WSM 1741 ^T	AXAU000000000	AXAU000000000	MK893248	AXAU000000000	-	AXAU000000000	AXAU000000000
<i>B. agreste</i> CNPSo 4010 ^T	NZ_JACCHP P000000000.1	NZ_JACCHP P000000000.1	MK893236.1	NZ_JACCHP P000000000.1	-	NZ_JACCHP P000000000.1	NZ_JACCHP P000000000.1
<i>B. glycinis</i> CNPSo 4016 ^T	JACCHQ 000000000.1	JACCHQ 000000000.1	MK893235.1	JACCHQ 000000000.1	JACCHQ 000000000.1	JACCHQ 000000000.1	JACCHQ 000000000.1
<i>B. diversitatis</i> CNPSo 4019 ^T	NZ_JACEGD 000000000.1	NZ_JACEGD 000000000.1	MK893234.1	NZ_JACEGD 000000000.1	-	NZ_JACEGD 000000000.1	NZ_JACEGD 000000000.1
<i>B. hipponense</i> aSej3 ^T	NZ_VSTH00000000.1	NZ_VSTH00000000.1	-	NZ_VSTH00000000.1	-	-	NZ_VSTH00000000.1
<i>B. septentrionale</i> 1S1 ^T	JAAOLE000000000	JAAOLE000000000	KF615620.1	JAAOLE000000000	-	JAAOLE000000000	JAAOLE000000000
<i>B. quebecense</i> 66S1 ^T	JABWSX000000000	JABWSX000000000	KF615618.1	JABWSX000000000	-	JABWSX000000000	JABWSX000000000

Tabela S3. Genes *nod* pesquisados nos 38 genomas das estirpes selecionadas do amendoim forrageiro, feijão-fava, soja e suas respectivas funções

<i>nodA</i>	Codifica uma aciltransferase que liga a cadeia acil ao carbono C-2 livre de acetil da extremidade não redutora do oligossacarídeo (DEBELLÉ et al. 1996). Atua após o gene <i>nodB</i> .
<i>nodB</i>	Desacetilase. Remove a porção N-acetil do terminal não redutor dos oligossacarídeos N-acetilglucosamina (SPAINK et al 1989; JOHN et al. 1993). Atua após a ação do gene <i>nodC</i> .
<i>nodC</i>	Responsável pela codificação da N-acetil-glucosaminiltransferase. Esta é responsável pela primeira etapa do fator Nod (GEREMIA et al. 1994). Elongação de cadeia.
<i>nodD1</i>	Codifica proteínas reguladoras que ativa a transcrição de operons <i>nod</i> na presença de sinais vegetais secretados como exsudatos na zona radicular (DEMONT et al. 1993).
<i>nodE</i>	Está envolvido na síntese de ácidos graxos (SHEARMAN et al., 1986; BIBB et al., 1989). É uma NL -acetiltransferase (SHEARMAN et al., 1986; BIBB et al. 1989; BLOEMBERG et al. 1995; DEBELLÉ et al. 1996).
<i>nodF</i>	Está envolvido na síntese de ácidos graxos (SHEARMAN et al., 1986; BIBB et al., 1989). Tem homologia com proteínas transportadoras de acil.
<i>nodI</i>	Exportação de fatores <i>nod</i> (CARDENAS et al. 1996, FERNANDEZ-LOPEZ et al. 1996, SPAINK et al. 1995).
<i>nodJ</i>	Exportação de fatores <i>nod</i> (CARDENAS et al. 1996, FERNANDEZ-LOPEZ et al. 1996, SPAINK et al. 1995).
<i>nodK</i>	Proteína envolvida na formação de nódulos fixadores de N_2 em leguminosas e Parasponia.
<i>nodL</i>	Acetilação. Em ambas as extremidades dos fatores <i>nod</i> , resíduos acetil podem ser encontrados; no C-6 dos terminais redutores ou não redutores (PERRET et al. 2000)
<i>nodM</i>	Glucosamina sintase responsável pelo fornecimento de açúcar para a síntese de oligossacarídeos de glucosamina (BAEV et al. 1992)
<i>nodN</i>	Glucosamina sintase responsável pelo fornecimento de açúcar para a síntese de oligossacarídeos de glucosamina (BAEV et al. 1992)
<i>nodO</i>	Responsável pela codificação de uma proteína de ligação ao Ca^{2+} . Acredita-se que canais catiônicos específicos são formados nas membranas das plantas leguminosas (ECONOMOU et al. 1990; SUTTON et al. 1994). Esta é uma proteína simbioticamente ativa.
<i>nodV</i>	Proteína ligada à membrana que detecta sinais da planta e traduz para o gene <i>nodW</i> (PERRET et al. 2000)
<i>nodW</i>	Ativa a expressão do gene <i>nod</i> (SANJUAN et al. 1994)
<i>nodZ</i>	A substituição da fucose, um tipo de açúcar, é frequente. Este gene é responsável pela sua adição aos fatores <i>nod</i> em diversos rizóbios (STACEY et al. 1994; LÓPEZ-LARA et al. 1995, MERGAERT et al. 1996, QUESADA-VINCENS et al. 1997, QUINTO et al. 1997)

Fig. S1. Filogenia baseada no gene *nodD1* (504 pb) mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (41). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo estatístico utilizado foi *omaximum-likelihood*. O número de acesso dos genomas das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* é dado na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde.

Fig. S2 Filogenia baseada na sequência do gene *nodI* (758 pb) apresentando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (25). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo estatístico usado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde.

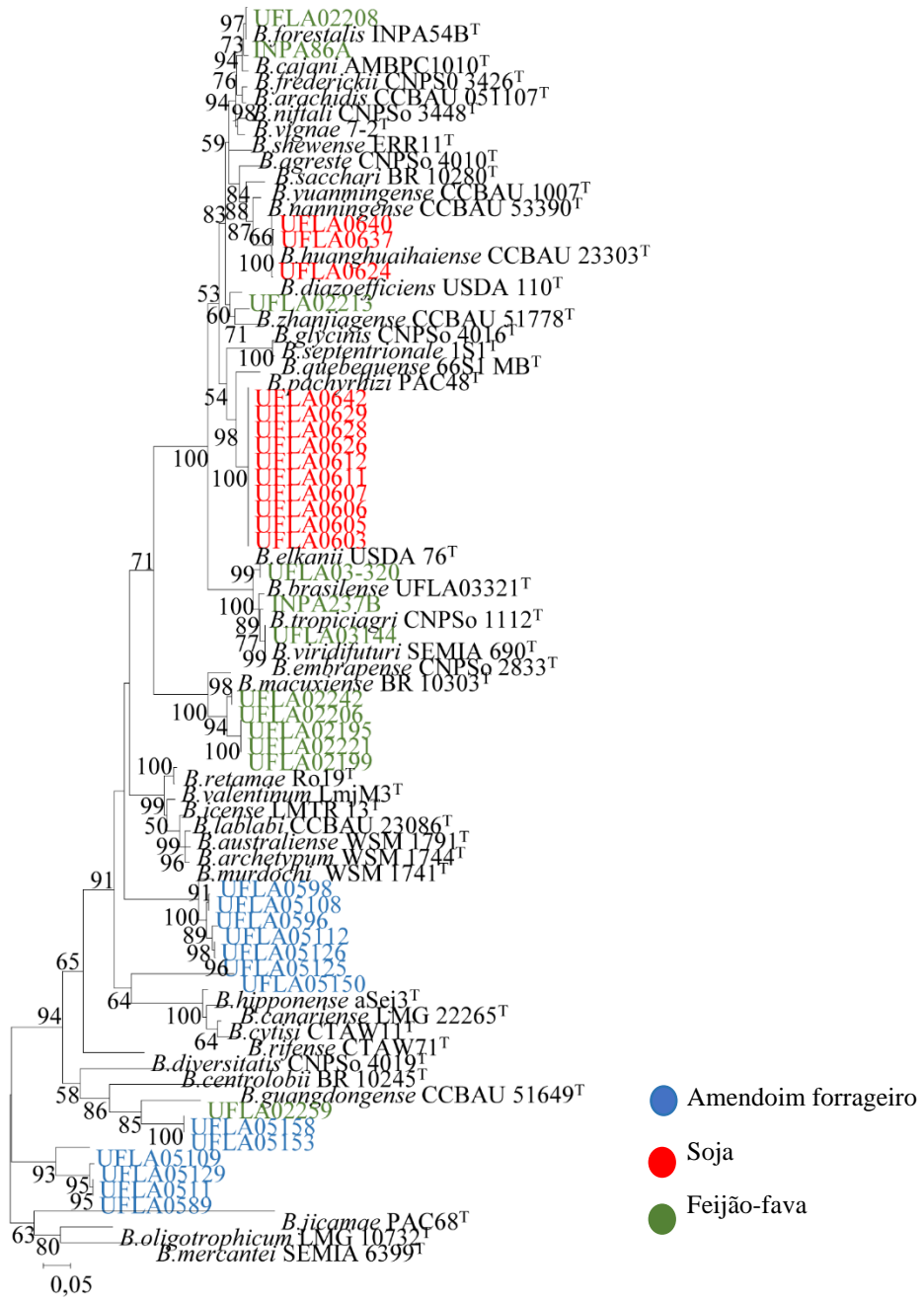
Fig. S3 Árvore filogenética do gene *nodJ* (792 pb) mostrando a relação entre as estirpes deste estudo e as estirpes tipo das espécies já descritas do gênero *Bradyrhizobium* (34). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo estatístico utilizado foi o *maximum-likelihood*. O código de acesso dos genomas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde.

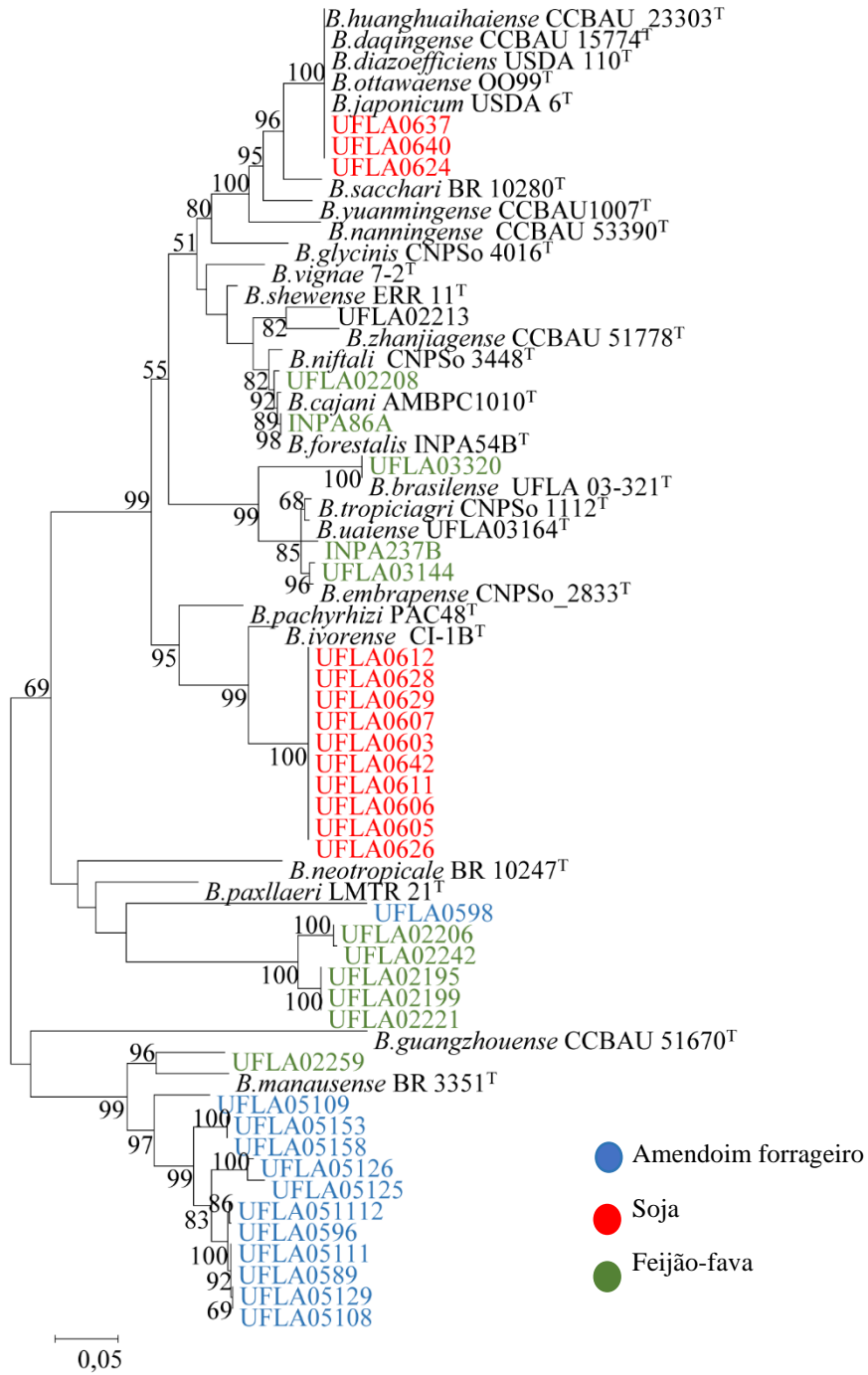
Fig. S4 Filogenia do gene *nodN* (315 pb) mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (49). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo estatístico utilizado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso dos genomas das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* é dado na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde.

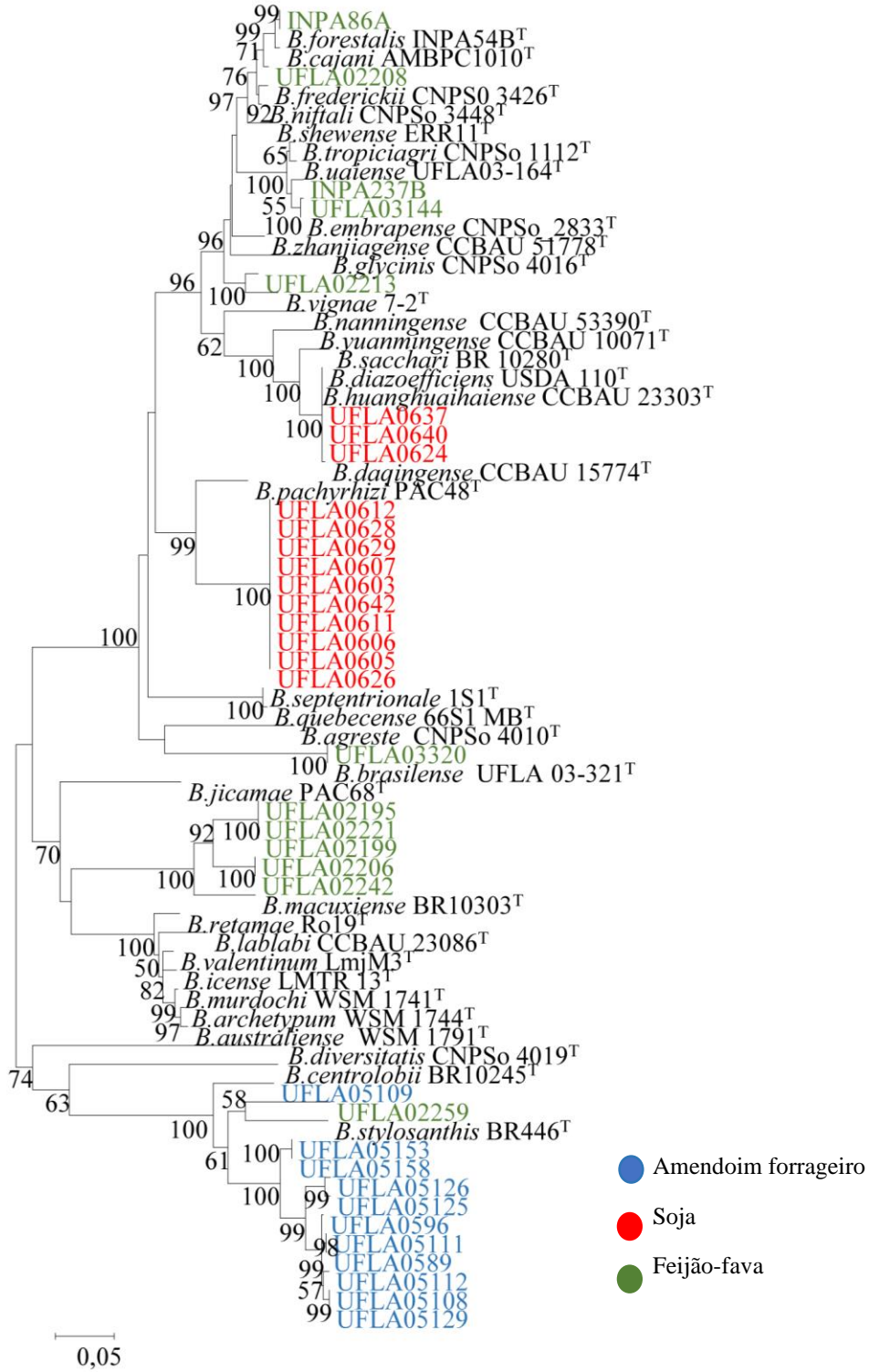
Fig. S5 Árvore filogenética do gene *nodZ* (396 pb) apresentando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (8). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo estatístico usado foi o *maximum-likelihood*. As estirpes na cor azul são do amendoim forrageiro; cor vermelha as estirpes de soja e as estirpes de cor verde feijão fava.

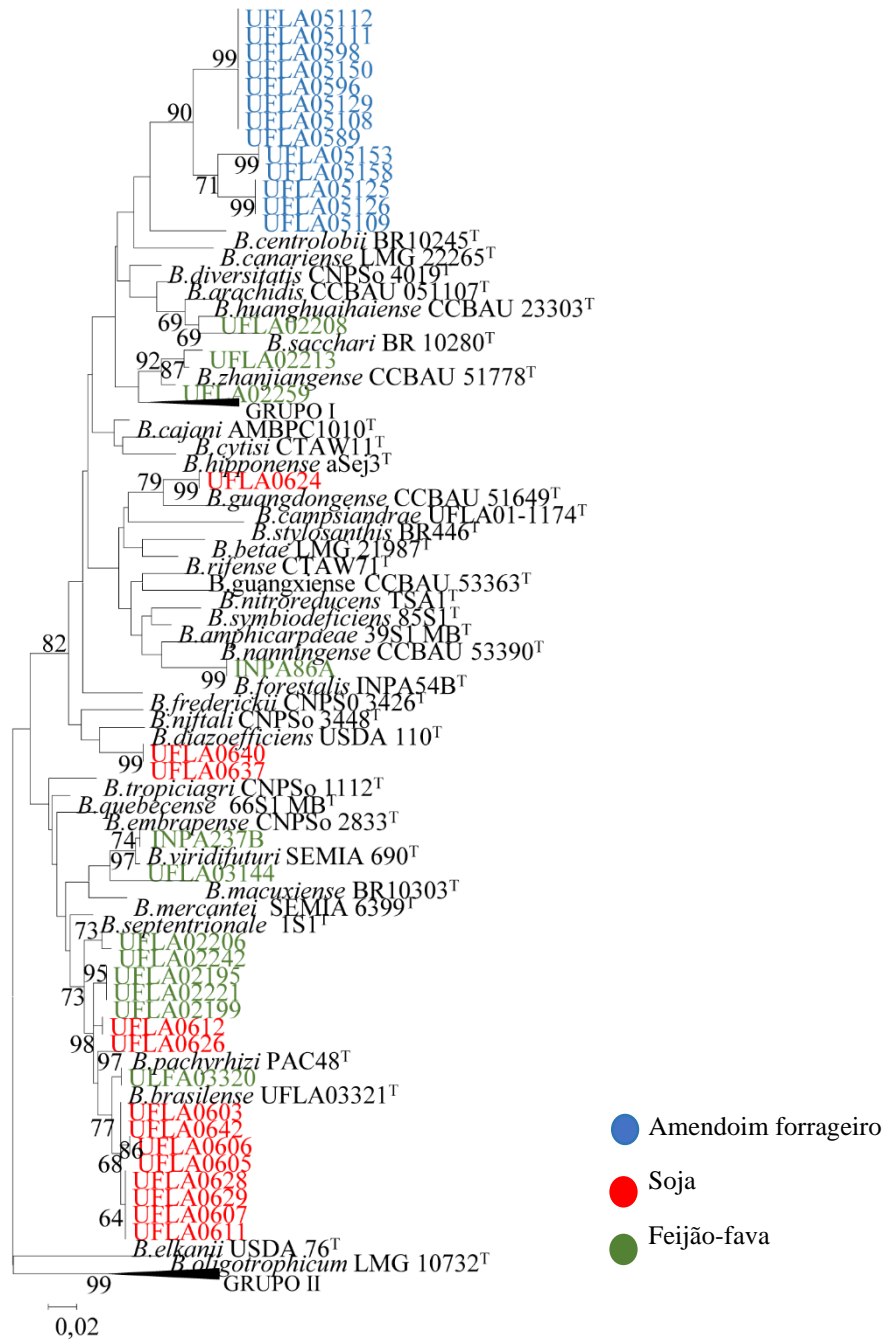
Fig. S6 Árvore filogenética do gene *nodW* (583 pb) apresentando a relação entre as estirpes em estudo. Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo estatístico usado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso dos genomas das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* é dado na tabela S1. As estirpes na cor azul são do amendoim forrageiro; cor vermelha as estirpes de soja e as estirpes de cor verde feijão fava

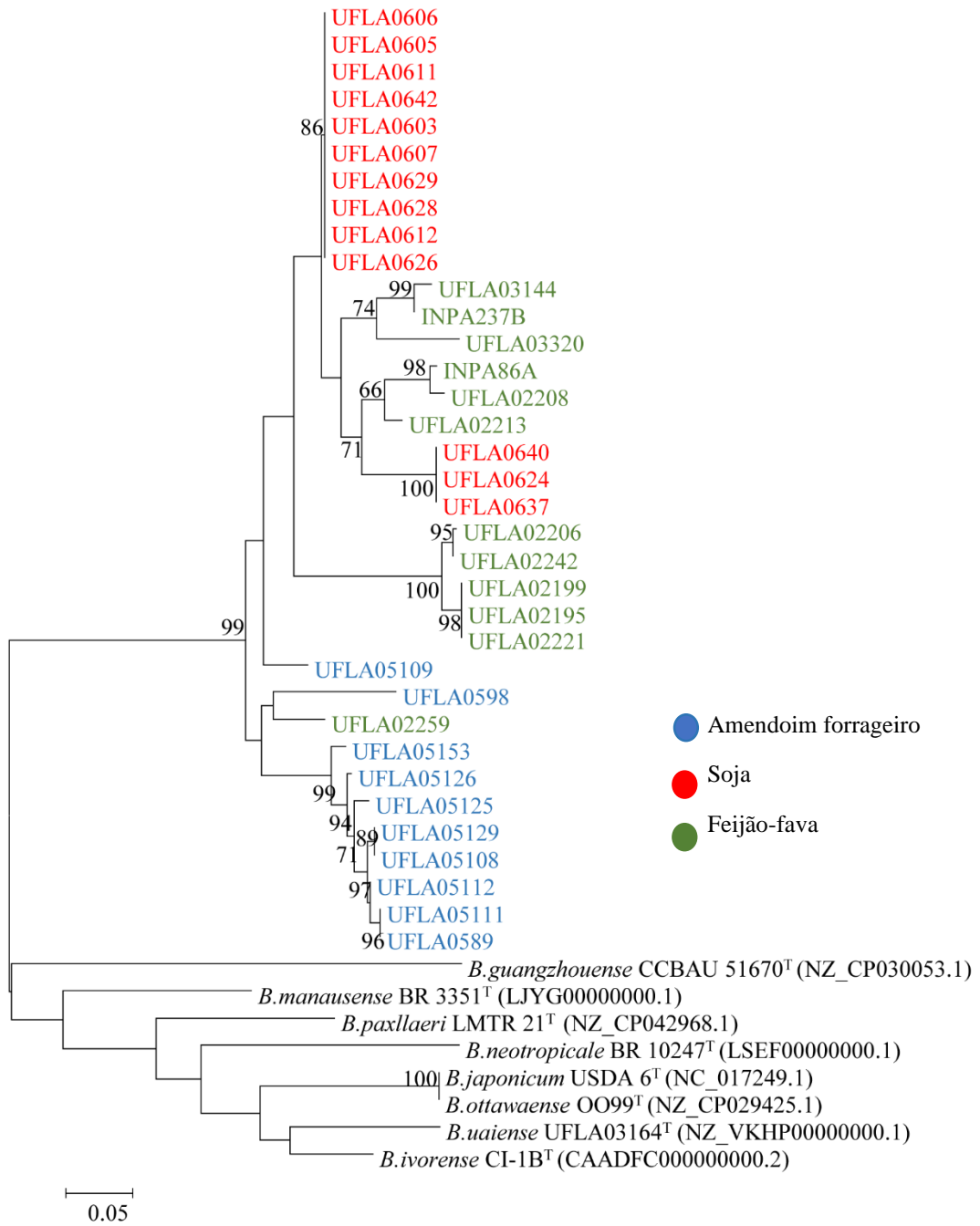
Fig. S7 Matriz completa do ANI com as 38 estirpes deste estudo mais as estirpes tipo de espécies de *Bradyrhizobium* já descritas

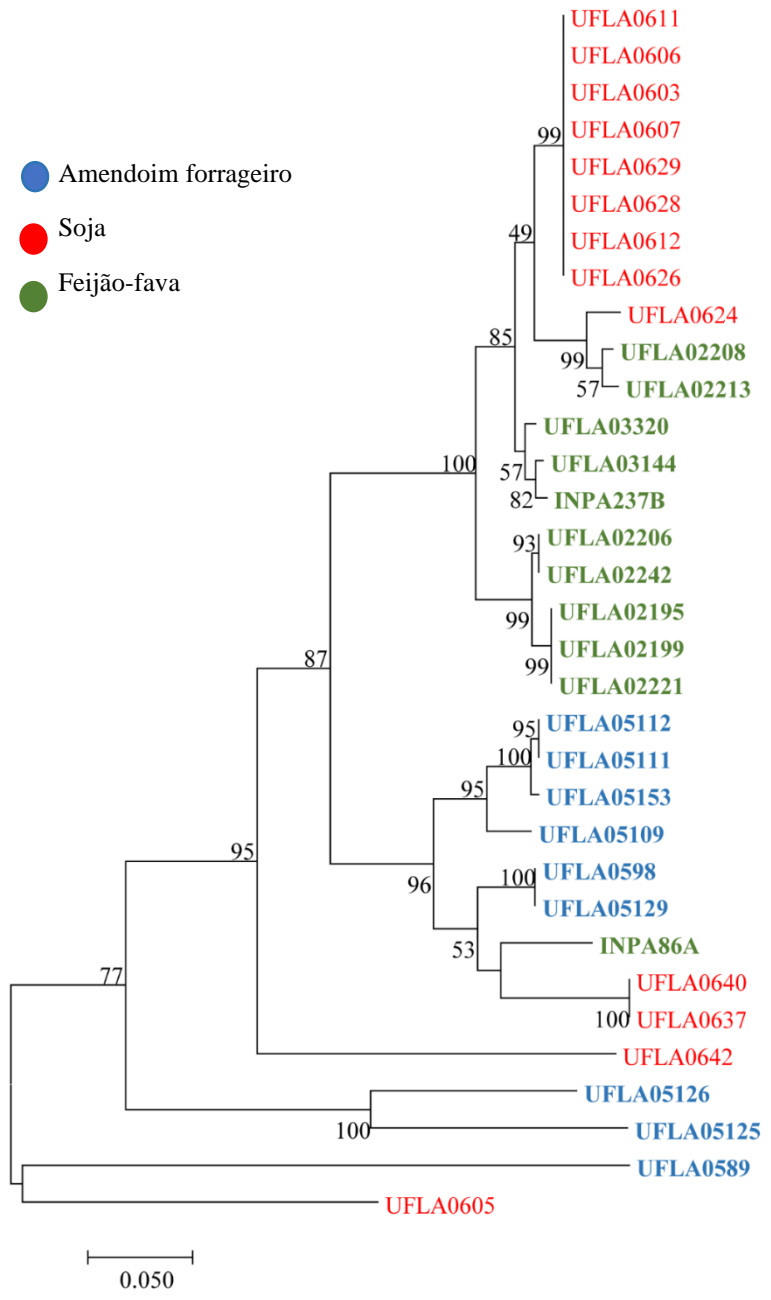












Script Microbeannotator:

#Baixar o instalador gráfico

```
wget https://repo.anaconda.com/archive/Anaconda3-2020.11-Linux-x86_64.sh
```

```
AnacondaAnaconda3-2020.11-Linux-x86_64.sh
```

```
# Adicionando os canais conda requeridos para instalar os pré-requisitos
conda config --add channels conda-forge
```

```
conda config --add channels bioconda
```

```
conda config --add channels cruizperez
```

Criando o ambiente microbeannotator

```
conda create -n microbeannotator microbeannotator blast hmmer ruby=2.5.1 paralleldiamond
```

```
sword seaborn biopython pywget
```

Inserindo o IBM Aspera Connect (/home/danielecamichel/.aspera/connect)

```
wget https://download.asperasoft.com/download/sw/connect/3.9.8/ibm-aspera-connect-3.9.8.176272-linux-g2.12-64.tar.gz
```

```
tar xvfz ibm-aspera-connect-3.9.8.176272-linux-g2.12-64.tar.gz
bash ibm-aspera-connect-3.9.8.176272-linux-g2.12-64.sh
```

```
export PATH="$PATH:/home/[user]/.aspera/connect/bin
source ~/.bashrc
```

#KofamScan

```
mkdir kofamscand
```

```
cd kofamscan
```

```
wget ftp://ftp.genome.jp/pub/db/kofam/ko_list.gz
```

```
wget ftp://ftp.genome.jp/pub/db/kofam/profiles.tar.gz
```

```
wget ftp://ftp.genome.jp/pub/tools/kofam_scan/kofam_scan-1.3.0.tar.gz
```

O nome kofam_scan-1.3.0.tar.gz está diferente dos comandos posteriores

```
mv kofam_scan-1.3.0.tar.gz kofamscan-1.3.0.tar.gz
```

Descomprimir e comprimir:

```
gunzip ko_list.gz
```

```
tar xvfz profiles.tar.gz
```

```
tar xvfz kofamscan-1.3.0.tar.gz
```

```
cd kofamscan-1.3.0
```

```
cp config-template.yml config.yml
```

Ao utilizar o vim não esquecer de antes de alterar o usuário, retirar o hastag e deletar o espaço que fica.

```
vim config.yml
```

Caminho para seu banco de dados KO-HMM

O banco de dados pode ser .hmm file, a .hal ou um diretório em que arquivos .hmm estão.

Omite a extensão se for .hal ou .hmm file

```
# profile: profile: /home/danielecamichel/kofamscan/profiles/prokaryote
```

Caminho para o arquivo da lista KO

```
# ko_list: /home/danielecamichel/kofamscan/ko_list
```

```

# Caminho para um arquivo executável hmm
# Você não precisa definir isso se estiver em seu $PATH
# hmmsearch: /usr/local/bin/hmmsearch

# Caminho para um arquivo executável do GNU paralelo# Você não
precisa definir isso se estiver em seu $PATH # parallel:
/usr/local/bin/parallel

# Número de processos de busca hmm para processarem paralelocpu: 2

# Para verificar o ambiente que se está trabalhandoconda info –
envs

# Para ativar o ambiente virtual conda
activate microbeannotator

# Para verificar o ambiente que se está trabalhandoconda info –
envs

# Para ativar o ambiente virtual
conda activate microbeannotator

git clone https://github.com/cruizperez/MicrobeAnnotator.git

# No interior da pasta Microbeannotator
microbeannotator_db_builder -h
microbeannotator_db_builder -d MicrobeAnnotator_DB -m blast -t 2 --light

#Resultados
#Dentro da pasta MicrobeAnnotator_DB:
#01.Protein_DB
#02.MicrobeAnnotator.db

# Fazer uma pasta para colocar os genomas - dentro de Microbeannotatormkdir input
cd input

# Dentro de Microbeannotator
microbeannotator --kofam bin/home/danielecamichel/kofamscan/kofamscan-1.3.0 -iUFLA01 -o
annotation -m blast -d ./Microbeannotator-DB -p 2 -t 2

```

ARTIGO 04 - *Bradyrhizobium uflense* sp. nov. a new symbiotic species isolated from soybean in Minas Gerais, Brazil

Artigo de acordo com as normas da revista Archives of Microbiology (Versão preliminar)

1 ***Bradyrhizobium uflense* sp. nov. a new symbiotic species isolated from soybean in Minas Gerais, Brazil**

2

3 Daniele Cabral Michel¹ (ORCID: 0000-0001-8347-1956), Paula Rose de Almeida Ribeiro² (0000-0003-3620-
4 3689), Jordana Luísa de Castro¹ (ORCID: 0000-0002-5883-4863), Amanda Azarias Guimarães¹ (ORCID: 0000-
5 0002-1945-7356), Teotonio Soares de Carvalho¹ (ORCID: 0000-0001-6631-5177), Fatima Maria de Souza
6 Moreira^{1*} (ORCID: 0000-0003-0159-5811)

7

8 ¹Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade
9 Federal de Lavras, Campus UFLA, 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

10 ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152, s/n Zona Rural 56302970,
11 Petrolina - PE, Brazil.

12

13 *Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail address: fmoreira@ufla.br (F.M.
14 de Souza Moreira).

15

16 **Running title:** *Bradyrhizobium uflense* sp. nov.

17 **Abstract**

18 Two strains belonging to the *Bradyrhizobium* genus were isolated from nodules of *Glycine max* L. grown in soil
19 from Minas Gerais (state), Brazil. Ribosomal gene sequence analysis placed UFLA06-05^T and UFLA06-06 closely
20 to *B. brasilense* UFLA03-321^T (100%), *B. pachyrhizi* PAC 48^T (100%), *B. ripae* WR4^T (100%), and *B. elkanii*
21 USDA 76^T (100%). Similar to the 16S rRNA result, the closest *Bradyrhizobium* species in multilocus sequence
22 analysis of five genes (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, and *atpD*) were *B. brasilense* UFLA03-321^T (97.3%) and *B.*
23 *pachyrhizi* PAC 48^T (97.2%). The average nucleotide identity of the two UFLA strains and the closest species were
24 lower than 94.9%. Based on the current data, these two strains represent a novel species, for which the name
25 *Bradyrhizobium uflense* is proposed. The type strain is UFLA06-05^T. The G+C content in the DNA of UFLA06-
26 05^T is 63.8 mol%.

27

28

29 **Keywords:** Biological nitrogen fixation, *Bradyrhizobium*, taxonomy

30

31

32

33

34

35

36 Introduction

37 The genus *Bradyrhizobium*, proposed by Jordan (1982) for all slow-growing strains from the *Rhizobium*
38 genus, includes species able to fix nitrogen and form symbiotic nodules in legumes. It includes species that can
39 live symbiotically and/or endophytically with legume and non-legume hosts (Chaintreuil et al. 2000). There are
40 also photosynthetic bacteria within this genus (Young et al. 1991; So et al. 1994). Its members are adapted to
41 diverse edaphic and climatic conditions since it has a broad geographic distribution (Sprent et al. 2017). This
42 rhizobial group is especially important for Brazilian agriculture because some strains belonging to this group are
43 recommended and widely used as inoculants for *Glycine max* L. production (Alves et al. 2003) and are highly
44 efficient in the biological nitrogen fixation (BNF) process, such as *B. elkanii* (SEMIA 587), *B. diazoefficiens*
45 (SEMIA 5080), *B. japonicum* (SEMIA 5079), and *B. elkanii* (SEMIA 5019), with this crop.

46 Up to this time, 82 species of *Bradyrhizobium* have been described. Of these, thirteen have been isolated
47 from soybean: *B. elkanii* 76^T (Kuykendall et al. 1992), *B. japonicum* USDA 6^T (Jordan DC 1982), *B. liaoningense*
48 LMG 18230^T (Xu et al. 1995), *B. daqingense* CCBAU 15774^T (Wang et al. 2013), *B. diazoefficiens* USDA 110^T
49 (Delamuta et al. 2013), *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T (Zhang et al. 2012), *B. ottawaense* OO99^T (Yu et
50 al. 2014), *B. amphicarphaeae* 39S1MB^T (Bromfield et al. 2019), *B. symbiodeficiens* 85S1^T (Bromfield et al. 2020),
51 *B. diversitatis* CNPSo 4019^T (Klepa et al. 2021), *B. septentrionale* 1S1^T (Bromfield et al. 2021), *B. quebecense*
52 66S1MB^T (Bromfield et al. 2021), *B. cosmicum* 58S1^T (Wasai-Hara et al. 2020) and *B. brasilense* sv. sojae (Costa
53 et al., 2020). Soybean is the legume species from which the largest number of *Bradyrhizobium* species have been
54 isolated, and this can be explained by the huge areas used to grow this economically important species throughout
55 the world, as well as the high affinity between this plant species and bacteria from this genus, as frequently
56 observed in fields over the years. Recently, a new symbiovar named *B. brasilense* sv. sojae, comprising efficient
57 N₂-fixing native isolates from soybean in northeast Brazil, was described (Costa et al. 2020), confirming the natural
58 occurrence of this *Bradyrhizobium* phenotype in Brazilian soils.

59 Previous phylogeny of 16S rRNA showed that the UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains, isolated from
60 soybean, belong to the *Bradyrhizobium* genus. A concatenation of five housekeeping genes positioned both UFLA
61 strains in a cluster separated from other *Bradyrhizobium* species already described (Ribeiro et al. 2015). Therefore,
62 we performed studies to describe this new rhizobial species by including a new phylogenetic analysis of
63 housekeeping genes with recently described *Bradyrhizobium* species and average nucleotide identity (ANI)

64 (Konstantinidis and Tiedje 2005). From both examinations, UFLA06-05^T and UFLA06-06 were not similar to any
65 other currently known *Bradyrhizobium* species.

66 **Materials and methods**

67 **Origin of the strain**

68 The UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains were isolated from nodules of soybean (*Glycine max* L.) used
69 as a trap plant in an experiment conducted in a greenhouse at the Soil Biology, Microbiology, and Biological
70 Processes Laboratory of the Department of Soil Science at the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG,
71 Brazil. The two UFLA strains were obtained from dilution of soil samples from Minas Gerais in the Southeast of
72 Brazil and were inoculated on soybean seedlings in the experiment (Ribeiro et al. 2015).

73 For isolation and characterization of the strains, Medium 79 (Fred and Waksman 1928) was used. These
74 two strains have been deposited in the UFLA bacteria collection of the Department of Soil Biology, Microbiology,
75 and Biological Processes at UFLA and in the BCCM/LMG bacteria collection at Ghent University, Belgium
76 (UFLA06-05^T = LMG; UFLA06-06 = LMG).

77

78 **Whole genome sequencing**

79 To obtain the genome sequences of the two UFLA strains, they were grown in Medium 79 liquid culture
80 for 4-5 days. After that, a 1 mL aliquot of this medium was transferred to microtubes to proceed with the DNA
81 extraction protocol from the Wizard® Genomic DNA Purification kit. The library preparation of the genomic
82 DNA was performed using the NexteraXT library kit (Illumina, CA, USA) following manufacturer's instructions.
83 KAPA SYBR® FAST qPCR with QuantStudio® 5 System (Applied Biosystems, CA, USA) was used to measure
84 the final library quantity. The library quality was evaluated by TapeStation HSD1000 ScreenTape (Agilent
85 Technologies, CA, USA). Illumina® 8-nt dual-indices were used. Based on QC values, equimolar pooling of
86 libraries was performed, and pair-end reads (2X150 bases) were sequenced on an Illumina® HiSeq X (Illumina,
87 CA, USA) with a read length configuration of 150 PE for 1.6 M PE reads (0.8 M in each direction) per sample.
88 The de novo assembly of UFLA06-05^T and UFLA06-06 was performed using SPADes 3.13.0 (Bankevich et al.
89 2012). The quality and completeness of the genomes were checked with CheckM 1.0.18 (Parks et al. 2015). The
90 genes were annotated with RAST (Aziz et al. 2008). All these analyses were performed using the Kbase platform
91 (<https://www.kbase.us/>).

92 **Phylogenetic characterization**

93 DNA extraction of the two UFLA strains was through the alkaline lysis method (Niemann et al. 1997).
94 Sequences of 16S rRNA, housekeeping (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, *atpD*), *nodC*, and *nifH* genes were amplified and
95 genetically characterized. The cycles, temperatures, and primers used to amplify housekeeping genes using
96 polymerase chain reaction (PCR) are described in Ribeiro et al. (2015). Partial sequences of *recA* (381 bp), *gyrB*
97 (516 bp), *rpoB* (459 bp), and *atpD* (395 bp) genes of the two UFLA strains were obtained from Ribeiro et al.
98 (2015). The 16S rRNA (1245 bp), *glnII* (480 bp), *nodC* (363 bp), and *nifH* (171 bp) genes were extracted from
99 UFLA06-05^T and UFLA06-06 whole genomes deposited under accession numbers JADCPZ000000000 and
100 JADFUD000000000, respectively, in the DDBJ/ENA/GenBank. Multilocus sequence analysis (MLSA) was
101 carried out by concatenating five housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, and *atpD*) to assess the
102 phylogenetic relationship between UFLA06-05^T and UFLA06-06 and all other currently described
103 *Bradyrhizobium* species.

104 The sequences were aligned using Muscle (Edgar 2004). The alignment was edited, and the phylogeny of
105 the sequences was carried out with the MEGA7 software package (Kumar et al. 2016). Phylogenetic trees were
106 constructed by the neighbor joining (NJ) (Saitou and Nei 1987) and maximum likelihood (ML) (Felsenstein 1981)
107 statistical methods with bootstrap, based on 1000 replications. The distance model used for both trees was the
108 Tamura 3-parameter model (Tamura 1992). In addition, phylogenetic analyses of symbiotic genes (*nodC* and *nifH*)
109 were also performed using the same methods mentioned above.

110 For the phylogenetic trees, sequences of the 16S rRNA, housekeeping, *nodC*, and *nifH* genes of all the
111 *Bradyrhizobium* species were obtained from Genbank (NCBI). For some *Bradyrhizobium* type strains, sequences
112 of specific genes were extracted from their genomes. The genes and genome accession number of each strain are
113 listed in Table S1.

114

115 **Genomic comparison between the UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains**

116 The phylogeny of all housekeeping genes evaluated showed 100% of similarity between UFLA06-05^T
117 and UFLA06-06. Considering that, the genomes of both UFLA strains were compared using the Progressive
118 MAUVE software (Darling et al. 2010). The results obtained showed that UFLA06-05^T and UFLA06-06 are not
119 clones (Fig. S1 and score assembly -supplementar material). The assembled genomes of both UFLA06-05^T

120 (JADCPZ000000000) and UFLA06-06 (JADFUD000000000) have been deposited in the NCBI (National Center
121 for Biotechnology Information. In view of this result, the description of the proposed new species was carried out
122 using the UFLA06-05^T and UFLA06-06.

123

124 **Average nucleotide identity (ANI) and G+C content**

125 Currently, ANI is one of the most robust and widely used measures to determine species boundaries
126 (Konstantinidis and Tiedje 2005; Richter and Rosseló-Móra 2009). Through this methodology, the genome of two
127 strains is compared, and the genetic relatedness between them is calculated. Thus, appropriate description of a new
128 rhizobial species requires evidence of genomic differences between the proposed new species with the nearest
129 species, obtained in concatenation analysis. Therefore, the genome of UFLA06-05^T was sequenced to support the
130 designation of a new species. The genome of the type strain of the proposed new species was compared with the
131 closest *Bradyrhizobium* species using the Kbase platform (<https://www.kbase.us/>) through Compute ANI with the
132 FastANI v.0.1.2 application (Goris et al. 2007; Jain et al. 2018).

133 The G+C contents of both UFLA strains were obtained from the draft genomes obtained in this study.

134

135 **Phenotypic characterization**

136 For phenotypic characterization, the two strains were evaluated in their ability to grow in Medium 79 at
137 different temperature (15, 20, 28, 34, 37, and 40 °C) and pH (4, 5.5, 6.8, 8, 9, and 10) values, following Florentino
138 et al. (2010). In addition, analysis was performed of their ability to grow at several NaCl concentrations (w/v)
139 (0.01, 0.25, 0.5, 0.75, and 1 %), as well as their ability to assimilate 14 carbon sources (citric acid, _D-fructose,
140 glycerol, glycine, _D-glucose, glutamine, _L-glutamic acid, lactose, malic acid, maltose, mannitol, methionine,
141 sodium lactate, and sucrose) and 6 nitrogen sources (_L- asparagine, casein hydrolysate, _L-cysteine, glycine, _L-
142 glutamic acid, and _L-methionine) in modified Medium 79, as described in Costa et al. (2017a). In addition, the
143 UFLA strains were characterized using the API 20NE kit (bioMérieux), following manufacturer's instructions.
144 The turbidity of cell optical density was adjusted to the 5.0 McFarland standard.

145 Furthermore, assessment was made of the ability to resist the following antibiotics: ciprofloxacin (5 µg
146 mL⁻¹), ampicillin (10 µg mL⁻¹), doxycycline (30 µg mL⁻¹), erythromycin (15 µg mL⁻¹), kanamycin (30 µg mL⁻¹),

147 chloramphenicol (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and streptomycin (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). All phenotypic tests were evaluated after
148 incubation of UFLA06-05^T and UFLA06-06 cultures for 7 days.

149

150 **Results and discussion**

151 **Phylogenetic characterization**

152 There was no difference in phylogenetic trees constructed by the NJ (data not shown) and ML (Fig. 1)
153 methods. Based on phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, the two UFLA strains were positioned in the
154 same superclade of *B. elkanii* USDA 76^T, and there was 100% similarity between them and four other
155 *Bradyrhizobium* species (*B. ripae* WR4^T, *B. brasilense* UFLA03-321^T, *B. pachyrhizi* PAC48^T, and *B. elkanii*
156 USDA 76^T). The 16S rRNA gene has been widely used as an important molecular marker for phylogeny purposes
157 and as a backbone to classify prokaryotes (Woese et al. 1990). However, it has a high degree of conservation,
158 especially in some genera, including *Bradyrhizobium* (van Berkum and Fuhrmann 2000; Willems et al. 2001)
159 which prevents high resolution in species definition.

160 For more accurate discrimination between type strains from the *Bradyrhizobium* genus, a multilocus
161 sequence analysis (MLSA) has been successfully used in several studies for description of species (Rivas et al.
162 2009; Costa et al. 2018). That way, combined analysis of five housekeeping genes (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnIII*, and
163 *atpD*) was carried out. The results obtained by the two statistical methods, ML (Fig. 2) and NJ (data not shown)
164 were similar. The concatenated phylogenetic tree clearly showed that the UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains
165 were positioned separate from the other *Bradyrhizobium* type strains, with high statistical support (100%). Species
166 closest to the two UFLA strains were *B. brasilense* UFLA03-321^T (97.3%) and *B. pachyrhizi* PAC 48^T (97.2%).
167 This result agrees with the phylogeny based on the 16S rRNA gene because these two species were also among
168 those closest to both strains of this study. These data suggested that these two UFLA strains are a new
169 *Bradyrhizobium* species. To confirm this, the average nucleotide identity (ANI) approach was used.

170

171 **ANI and G + C content**

172 The genomic sequence of the UFLA06-05^T strain and the two closest *Bradyrhizobium* type strains, *B. brasilense*
173 UFLA03-321^T (97.3%) and *B. pachyrhizi* PAC48^T (97.2%), obtained from MLSA were used to calculate the ANI.
174 The ANI value obtained by comparing the UFLA strain with *B. brasilense* UFLA03-321^T and *B. pachyrhizi*

175 PAC48^T were 94.9% and 94.7%, respectively. Considering the cut-off value for species delineation of 95-96%
176 ANI (Goris et al. 2007; Richter and Rosselló-Móra 2009), the proposed new species was confirmed as genomically
177 distinct.

178 The G+C content in the DNA of the UFLA06-05^T strain was 63.8 mol%. This value is within the range
179 usually reported for *Bradyrhizobium* species (Xu et al. 1995; Chahbouneet et al. 2011; Ramírez-Bahena et al.
180 2012).

181

182 **Phenotypic characterization**

183 The UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains were able to grow at a wide range of pH values. They grew
184 between 20 and 34 °C, but not at 40 °C. The UFLA06-06 strain was the only one that showed weak growth at 15
185 °C and 37 °C. The two strains showed similar results for antibiotic resistance and for nitrogen and carbon
186 assimilation, except for the L-glutamic acid carbohydrate, which was positive for UFLA06-05^T and weak for
187 UFLA06-06. The main phenotypic characteristics of UFLA06-05^T and UFLA06-06 are listed in Table S3.

188

189 **Phylogeny of *nodC* and *nifH* genes**

190 The phylogenetic result of the gene involved in plant nodulation (*nodC*) showed that UFLA06-05^T and UFLA06-
191 06 formed a separate clade with *B. ferriligni* CCBAU 51502^T, *B. elkanii* USDA 76^T, and other strains from this
192 species, *B. elkanii* SEMIA 5019 and *B. elkanii* SEMIA 587, that were recently proposed as a new symbiovar sojaj
193 (Fig. 3) (Delamuta et al. 2017). The percentage of similarity between UFLA06-05^T and the other strains in the
194 same clade were higher than 96% (Table S2). In this same group are the recently described *B. brasilense* sv. sojaj
195 (UFLA06-13, UFLA06-15, UFLA06-19, UFLA06-22) (da Costa et al. 2020), which showed similarity values of
196 100% with the type strain UFLA06-05^T. The phylogenetic tree of the nitrogen-fixing gene (*nifH*) was very similar
197 to the one found for the *nodC* gene. A super clade was formed with *B. ferriligni* CCBAU51502^T, the *B. elkanii*
198 strains, the four strains from *B. brasilense* sv. sojaj, UFLA06-05^T, and UFLA06-06 (Fig. S1). As found for the
199 *nodC* gene, the percentage of similarity between UFLA06-05^T and all *Bradyrhizobium* strains in the same clade
200 were higher than 96% (Table S2).

201 It is noteworthy that the phylogeny of both symbiotic gene sequences (*nodC* and *nifH*) from UFLA06-
202 05^T and UFLA06-06 showed different phylogenetic positioning in MLSA analysis. This can be explained by the
203 horizontal transfer of symbiotic genes. Genes related to symbioses show different evolutive history compared with
204 housekeeping genes since they can be obtained from organisms of different species and even genera (Cummings
205 et al. 2009; Remigi et al. 2016).

206 Considering the similar results of the phylogeny of the two symbiotic genes (*nodC* and *nifH*), the grouping
207 of UFLA06-05^T and UFLA06-06 with all strains proposed as belonging to symbiovar *sojae* by Delamuta et al.
208 (2017) and da Costa et al. (2020) indicates that the two UFLA strains (UFLA06-05^T and UFLA06-06) belong to
209 this symbiovar. First, because they showed the same ability to nodulate soybean (*Glycine max* L.) as strains
210 belonging to symbiovar *sojae*. Secondly, taking the *nodC* gene into account, for example, previous reports have
211 described new symbiovars with a similarity percentage equal or greater than 92% among the *nodC* sequences
212 (Delamuta et al. 2017; da Costa et al. 2020).

213

214 **Description of *Bradyrhizobium uflense* sp. nov.**

215 *Bradyrhizobium uflense* (u.flen'.se N.L. neut. adj. uflense of UFLA, referring to the University where these two
216 strains were isolated and studied).

217 Cells are gram-negative rods, aerobic and non-spore-forming. Colonies have a diameter > 1 mm and are
218 cream-colored in Medium 79 after 7 days of incubation at 28 °C. The UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains are
219 able to grow at temperatures ranging from 15 °C to 34 °C, with optimal growth at 28 °C. The two UFLA strains
220 are able to grow at pH from 4 to 10 and showed tolerance to salinity up to the concentration of 0.75% NaCl. The
221 UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains are resistant to ampicillin (10 µg mL⁻¹), ciprofloxacin (5 µg mL⁻¹),
222 chloramphenicol (30 µg mL⁻¹), erythromycin (15 µg mL⁻¹), doxycycline (30 µg mL⁻¹), and streptomycin (10 µg
223 mL⁻¹). They are sensitive to kanamycin (30 µg mL⁻¹). They are able to assimilate _D-fructose, glycerol, _D-glucose,
224 glutamine, mannitol, and sodium lactate. They weakly assimilate lactose and malic acid. They are not able to
225 assimilate citric acid, glycine, maltose, methionine, and sucrose. The use of _L-arginine, casein hydrolysate, and _L-
226 glutamic acid as nitrogen sources is positive, whereas the use of _L-methionine is weak for the two UFLA strains.
227 The use of _L-cysteine and glycine is negative for both strains. The UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains show
228 positive results for urease and hydrolysis of esculin, whereas nitrate reduction, tryptophan deaminase, glucose

229 fermentation, hydrolysis of gelatin, and β -galactosidase are negative. For arginine dihydrolase, UFLA06-05^T is
230 positive, and UFLA06-06 is negative.

231 The type strain UFLA06-05^T was isolated from nodules of *Glycine max* L. grown in soils from Minas
232 Gerais, Brazil. The DNA G+C content of the type strain is 63.8 mol%.

233

234 **Acknowledgements**

235 We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (CAPES/PROEX
236 AUXPE 593/2018), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Process:
237 304527/2016-5; Process: 431504/2016-4), and the Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)
238 (CAG - RED-00330-16) for financial support and for granting scholarships. This research is associated with the
239 Brazilian National Institute of Science and Technology (Soil Biodiversity/INCT-CNPq).

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252 **References**

- 253 Alves BJR, Boddey RM, Urquiaga S (2003) The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant Soil* 252: 1-9
- 254
- 255 Aziz RK, Bartels D, Best AA et al (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems
256 Technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- 257 Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S,
258 Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes:
259 a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477
- 260 Bromfield ES, Cloutier S, Nguyen HDT (2019) Description and complete genome sequence of *Bradyrhizobium*
261 *amphicarpaeae* sp. nov., harbouring photosystem and nitrogen-fixation genes. *Int J Syst Evol Microbiol.*
262 69:2841-2848
- 263 Bromfield ES, Cloutier S, Nguyen HDT (2020) Description and complete genome sequences of *Bradyrhizobium*
264 *symbiodeficiens* sp. nov., a non-symbiotic bacterium associated with legumes native to Canada. *Int J Syst*
265 *Evol Microbiol.* 70:442-449
- 266 Bromfield ES, Cloutier S (2021) *Bradyrhizobium septentrionale* sp. nov. (sv. septentrionale) and *Bradyrhizobium*
267 *quebecense* sp. nov. (sv. septentrionale) associated with legumes native to Canada possess rearranged
268 symbiosis genes and numerous insertion sequences *Int J Syst Evol Microbiol.* 71(6): 004831.
- 269 Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar EJ (2011) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated
270 from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int Int J Syst Evol Microbiol* 61:2922-2927
- 271 Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Ba A, Gillis M, de Lajudie P, Dreyfus B (2000). Photosynthetic
272 bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.*
273 66:5437–5447.
- 274 Costa EM, Guimarães AA, Vicentin RP, Ribeiro PRA, Leão ACR, Balsanelli E, Lebbe L, Aerts M, Willems A,
275 Moreira FMS (2017a) *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated
276 from Brazilian tropical soils. *Arch Microbiol* 199:1211-1221
- 277 Costa EM, Guimarães AA, de Carvalho TS, Rodrigues TL, Ribeiro PRA, Lebbe L, Willems A, Moreira FMS
278 (2018) *Bradyrhizobium forestalis* sp nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of
279 forest legume species in the Amazon. *Arch Microbiol* 200:743-752
- 280 Costa EM, Ribeiro PRA, Carvalho TS, Vicentin RP, Balsanelli E, de Souza EM, Lebbe L, Willems A, Moreira
281 FMS (2020) Efficient Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Soybean Nodules in the Semi-arid Region of
282 Northeast Brazil are Classified as *Bradyrhizobium brasilense* (Symbiovar Sojae) *Curr. Microbiol.* 77:1746–
283 1755

- 284 Cummings, S.P., 2009. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic
285 cultivation of graminaceous crops; potential and problems. *Environ. Biotechnol.* 5:43–50.
- 286 Darling AE, Mau B., Perna NT, (2010.) ProgressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gain, Loss and
287 Rearrangement. *PloS One* 5: e11147
- 288 Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M (2013) Polyphasic
289 evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium*
290 *diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3342-3351
- 291 Delamuta JRM, Menna P, Ribeiro RA, Hungria M (2017) Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium*
292 symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new
293 symbiovars pachyrhizi and sojaj Syst. Appl. Microbiol. 40:254-265
- 294 Edgar R C (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids*
295 *Res* 32:1792–1797
- 296 Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*
297 17:368-376
- 298 Florentino LA, Sousa PM, Silva JS, Silva KB, Moreira FMS (2010) Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium*
299 strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species.
300 *Rev Bras Cienc Solo* 34:1113–1123
- 301 Fred EB, Waksman SA (1928) Laboratory manual of general microbiology with special reference to the
302 microorganisms of the soil. McGraw-Hill Book, New York, 145p
- 303 Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007) DNA–DNA
304 hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*
305 57:81-91
- 306 Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S (2018) High-throughput ANI Analysis of
307 90K Prokaryotic Genomes Reveals Clear Species Boundaries. 9:5114
- 308 Jordan, D C (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of
309 slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:136-139.
- 310 Klepa MS, Helene LCF, O'Hara G, Hungria M (2021) *Bradyrhizobium agreste* sp. nov., *Bradyrhizobium glycinis*
311 sp. nov. *Bradyrhizobium diversitatis* sp. nov., isolated from a biodiversity hotspot of the genus *Glycine* in
312 Western Australia *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71 1-13
- 313 Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *PNAS*
314 7:2567-2572

- 315 Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) Mega 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger
316 datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874
- 317 Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan
318 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol* 38:501–505
- 319 Niemann S, Puehler A, Tichy HV, Simon R, Selbitshka W (1997) Evaluation of the resolving power of three
320 different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti*
321 population. *J Appl Microbiol* 82:477–484
- 322 Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of
323 microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genomes Res* 25:1043-1055
- 324 Ramírez-Bahena MH, Chahboune R, Peix A, Velázquez E (2012) Reclassification of *Agromonas oligotrophica*
325 into genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*
326 63:1013-1016
- 327 Remigi P, Zhu J, Young PW, Masson-Boivin C (2016) Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing
328 Legume Symbionts 24:63-75
- 329 Ribeiro PRA, Santos JV, Costa EM Lebbe L, Louzada MO, Guimarães AA, Guimarães AES, Willems A, Moreira
330 FMS (2015) Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agr*
331 *Ecosyst Environ* 212:85–93.
- 332 Richter M, Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc*
333 *Natl Acad Sci USA* 106:19126-19131
- 334 Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*.
335 *Syst Appl Microbiol* 32:101–110
- 336 Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol*
337 *Biol Evol* 4:406-425
- 338 So RB, Ladha JK, Young JPW (1994) Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with
339 bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:392–403.
- 340 Sprent JI, Ardley J, James EK (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts.
341 *New Phytologist* 215:40-56
- 342 Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-
343 transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687
- 344 van Berkum P, Fuhrmann JJ (2000) Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed
345 from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int J Syst Evol Microbiol*
346 50:2165–2172

- 347 Wang JY, Wang R, Zhang YM, Liu HC, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Chen WX (2013) *Bradyrhizobium*
348 *daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules Int J Syst Evol Microbiol 63:616-624
- 349 Wasai-Hara S, Minamisawa K, Cloutier S, Bromfield E.S.P. (2020) Strains of *Bradyrhizobium comsmicum* sp.
350 nov., isolated from contrasting habitats in Japan and Canada possess photosynthesis gene clusters with the
351 hallmark of genomic islands. Int J Syst Evol Microbiol 70: 5063–5074
- 352 Willems A, Coopman R, Gillis M (2001) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium*
353 species. Int J Syst Evol Microbiol 51:111–117
- 354 Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organism: proposal for the domains
355 Archea, Bateria and Eukarya. Proceedings of the National Academy of Science of USA, Washington,
356 87:4576-4579
- 357 Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of
358 soybeans. Int J Syst Bacteriol 45:706-711
- 359 Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly (1991). Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAil
360 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16s rRNA gene segment. J. Bacteriol. 173:2271-2277
- 361 Yu X, Cloutier S, Tambong JT, Bromfield ESP (2014) *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen
362 fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. Int J Syst Evol Microbiol 64:3202-3207
- 363 Zhang YM, Li Y, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Li QQ, Zhang YZ, Zhou YG, Chen WX (2012) *Bradyrhizobium*
364 *huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.)
365 nodules. Int J Syst Evol Microbiol 62:1951-1957
- 366
- 367
- 368
- 369
- 370
- 371
- 372
- 373
- 374
- 375
- 376
- 377

378 Figure legends

379 **Fig. 1** Maximum likelihood phylogeny based on 16S rRNA gene sequences (1245 bp) showing the strains of the
380 new species (shown in bold) and type strains of the *Bradyrhizobium* genus. Bootstrap values greater than 50% are
381 indicated at nodes. *Bar*, 1 substitution per 100 nucleotide positions. The 16S rRNA sequence of *Bosea thiooxidans*
382 DSM9653^T was used as outgroup. Gene accession numbers of *Bradyrhizobium* species are given in parentheses.
383 Strains belonging to groups GI, GII, GIII are described in Table S4.

384 **Fig. 2** Maximum likelihood phylogeny based on concatenated *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, and *atpD* gene sequences
385 (2231 bp) showing the relationship between the strain of the *B. uflense* strains (shown in bold) and type strains of
386 the *Bradyrhizobium* species. Bootstrap values greater than 50% are indicated at nodes. *Bar*, 2 substitutions per 100
387 nucleotide positions. NCBI accession numbers of the strains are listed in Table S1. Strains belonging to groups
388 GI, GII are described in Table S4.

389 **Fig. 3** Maximum likelihood phylogeny based on the *nodC* (363 bp) gene sequence showing the relationship
390 between the strain of the new species (shown in bold) and type strains of the *Bradyrhizobium* genus. Bootstrap
391 values greater than 50% are indicated at nodes. *Bar*, 5 substitutions per 100 nucleotide positions. Gene accession
392 numbers for the strains are provided in parentheses. Strains belonging to group GI are described in Table S4.

393

394

395

396

397

398

399

400

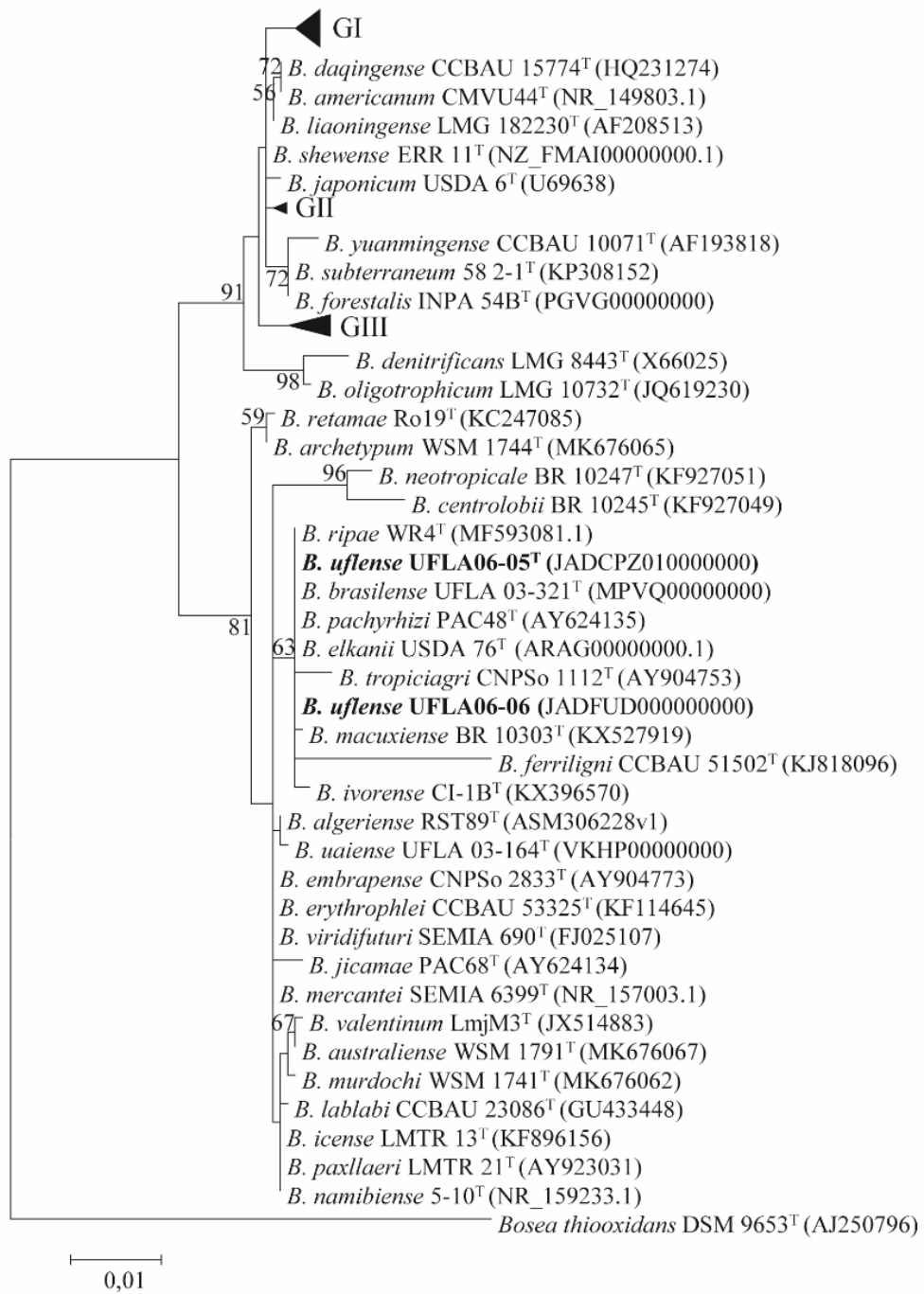
401

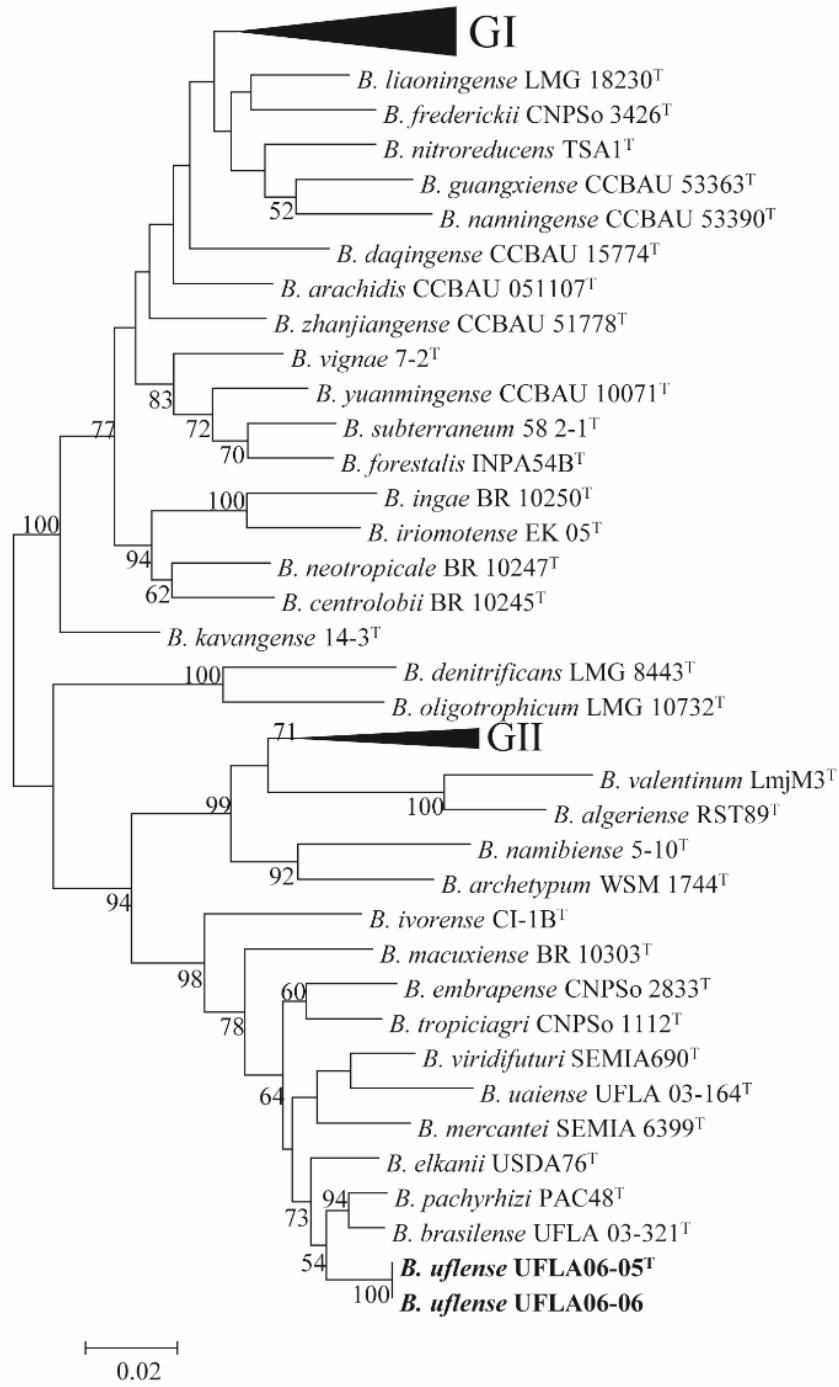
402

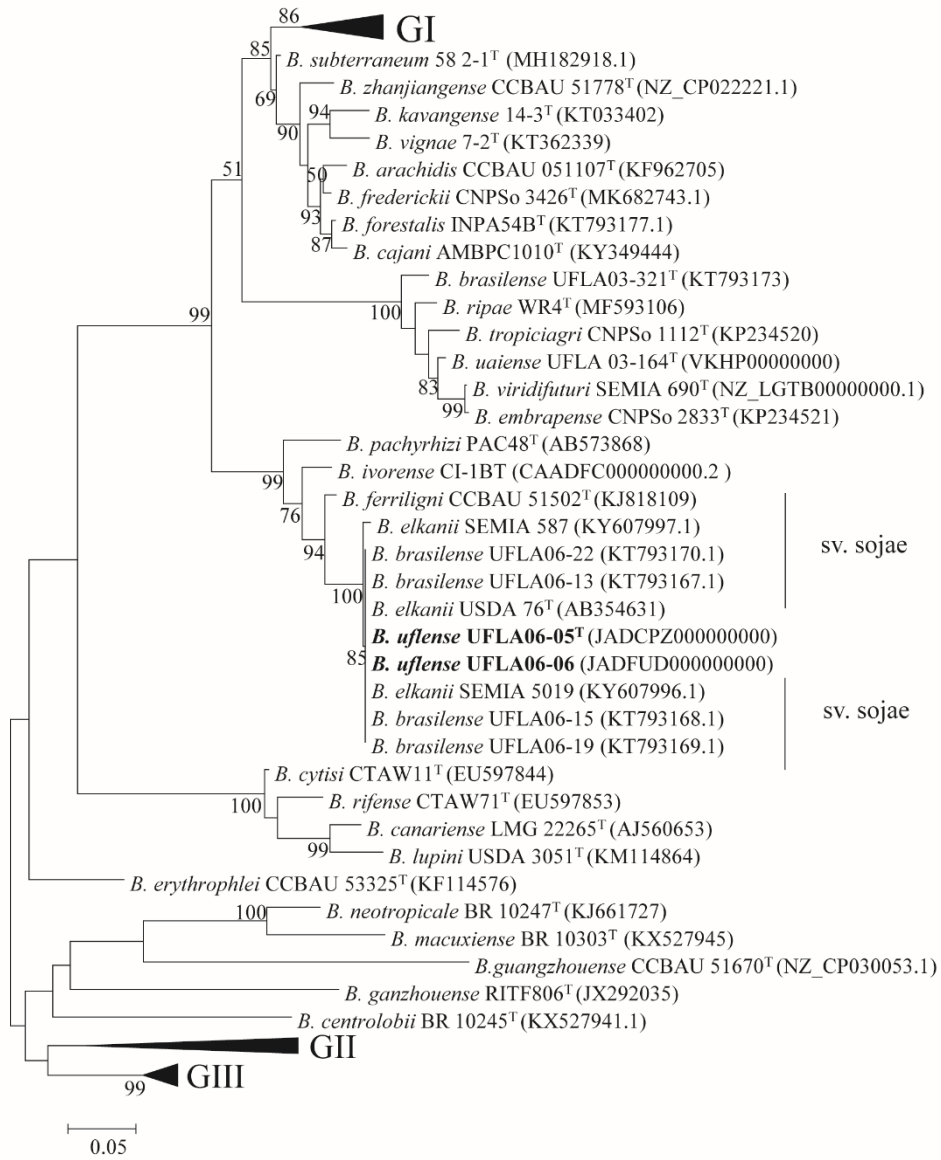
403

404

405







Archives of Microbiology

Supplementary material

***Bradyrhizobium uflense* sp. nov., a new symbiotic species isolated from soybean cultivated in Minas Gerais state, Brazil**

Daniele Cabral Michel, Paula Rose de Almeida Ribeiro, Jordana Luísa Castro, Amanda Azarias Guimarães, Teotonio Soares de Carvalho, Fatima Maria de Souza Moreira*

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail address: fmoreira@ufla.br (F.M. de Souza Moreira).

Table S1. Genbank accession number of housekeeping genes for *Bradyrhizobium uflense* sp nov. UFLA06-05^T and UFLA06-06 and from the type strains from *Bradyrhizobium* genus. Some housekeeping genes were obtained from strains genomes

Strains	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>	<i>atpD</i>
<i>B. uflense</i> UFLA06-05 ^T	KJ740088.1	KJ740048.1	JADCPZ010000000	KJ740134.1	KJ739961.1
<i>B. uflense</i> UFLA06-06	KJ740063.1	KJ740025.1	JADFUD000000000	KJ740106.1	KJ739936.1
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	KR149140	KR149134	KR149131	NZ_LGTB00000000.1	NZ_LGTB00000000.1
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	HM107233	JX437675	HM107251	JX437682	HM107217.1
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	AB353734	FM253217	AB353733	FM253260	FM253129.1
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	FM253177	FM253220	AY386765	FM253263	FM253135.1
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	GU001575	KF532653.1	GU001594	JN186288	GU001613.1
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	HQ231270	JX437669	HQ231301	JX437676	HQ231289.1
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	FM253196	FM253239	HM047121	FM253282	FM253153.1
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	AY591568	AM418800.1	AY599117	AM295348	ARAG00000000.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	HQ231595	JX437672	HQ231639	LM994169	HQ231682.1
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	JX943615	KF896201	KF896175	NZ_CP016428.1	KF896192.1
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	KF927061	KF927079	KF927067	KF927073	KY753593.1
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	AB300996	AB300997	AB300995	HQ587646	LM994395.1
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	AM182158	AB070586.1	HQ587875	AM295349	AM418753.1
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	HM047133	HQ873309	FJ428204	HQ587647	FJ428211.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	GU433522	JX437670	GU433498	JX437677	GU433473.1
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	FM253180.1	FM253223	AY386775	FM253266	AY386752.1
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	KF785992	KF786000	KF785986	NZ_LJYG00000000.1	NZ_LJYG00000000.1
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T	KJ661714	KJ661707	KJ661700	KF983829	NZ_LSEF00000000.1
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	JQ619231	KF962697	JQ619233	KF962713	JQ619232.1
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	HQ587287	HQ873179	HQ587750	HQ587518	HQ455212.1
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	HM047130	HQ873310	FJ428201	HQ587648	FJ428208.1
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	JX943617	KF896195	KF896169	KP308154	KF896186.1
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	KF962711	KF896204	KC247108	KF962714	KC247101.1
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	GU001585	KC569466	GU001604	KC569468	GU001617.1
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	FM253183	FM253226	AY386780	FM253269	AY386760.1
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	HQ634899	HQ634891	GQ160500	HQ634910	HQ634875.1
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	KC509269	KC509072	KC509023	KC509318	KC508916.1
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	KC509279	KC509082	KC509033	KC509328	KC508926.1
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	KM378399	KX661397.1	KM378446	KM378311	KX661392.1
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	JX518589	NZ_LLXX00000000.1	JX518575	NZ_LLXX00000000.1	JX518561.2
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	KM378374	NZ_RDQF00000000.1	KM378443	KM378308	NZ_RDQF00000000.1
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463	NC_004463
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	FJ391168	HQ634890	FJ391048	HQ634909	FJ390968.1
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	KX690615.1	KX690623	KX690621.1	NZ_MKFI01000001.1	NZ_MKFI01000001.1
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	PGVG00000000	KF452722.1

<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	KU724163.1	KU724151.1	KU724148.1	KU724166	ASM164133v1
<i>B. shewense</i> ERR11 ^T	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	KX527954.1	KX528004.1	KX527991.1	KF983827.3	NZ_LUUB00000000.1
<i>B. brasiliense</i> UFLA 03-321 ^T	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000	MPVQ00000000
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	KX527958.1	KX528008.1	KX527995.1	KX527969.1	NZ_LNCU01000024.1
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	KM378377.1	KX661393.1	KM378440.1	KM378306.1	KX661387.1
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000	LFJC00000000
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	FJ264927.1	PYCM00000000.1	FJ264924.1	PYCM00000000.1	PYCM00000000.1
<i>B. frederickii</i> CNPS0 3426 ^T	MK682710.1	MK682721.1	MK682688.1	MK682699.1	SPQS00000000.1
<i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T	KC509274	KC509077.1	KC509028	KC509323.1	KC508921.1
<i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T	KC509254	KC509057.1	KC509008	KC509303.1	KC508902.1
<i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	KC509263	KC509066.1	KC509017	KC509312.1	KC508911.1
<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T	KF615036	KP768725	KP768609	KP768667	KP768551
<i>B. amphicarpae</i> 39S1 MB ^T	KF615002.1	KP768721.1	KP768605	KP768663	KP768547.1
<i>B. uaiense</i> UFLA03-164 ^T	KT793144.1	KT793133.1	VKHP00000000	VKHP00000000	KF452739.1
<i>B. ivorensis</i> CI-1B ^T	MK376330	MH756161	MH756157	KX388393	CAADFC00000000.2
<i>B. niftali</i> CNPS0 3448 ^T	MK675797	MK675794	MK675791	MK675800	SPQT00000000.1
<i>B. campsiandrae</i> UFLA01-1174 ^T	KT793146.1	KT793134.1	JAANIH00000000.1	JAANIH00000000.1	KT793128.1
<i>B. archetypum</i> WSM 1744 ^T	MK863448	MK860868	MK860847	JAAVLW00000000	MT070745
<i>B. australiense</i> WSM 1791 ^T	MK863450	MK860870	MK860849	JAAVLX00000000	MT070746
<i>B. murdochi</i> WSM 1741 ^T	MK863445	MK860865	MK860844	AXAU00000000	MT070743

Table S2. Percentage of similarity within *Bradyrhizobium uflense* and between *B. uflense* UFLA06-05^T and all *Bradyrhizobium* species described in 16S rRNA, housekeeping genes and symbiotic genes.

Strains	<i>B. uflense</i> UFLA06-05 ^T								
	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoB</i>	<i>glnII</i>	<i>atpD</i>	five genes*	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
<i>B. uflense</i> UFLA06-06	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	99.8	95.3	97.0	98.2	94.3	94.4	95.2	70.0	90.9
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	96.8	92.3	88.2	82.5	83.7	88.6	86.1	78.8	86.6
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	97.3	85.9	88.4	73.1	79.2	87.8	80.9	-	-
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	97.4	86.6	89.5	71.1	79.2	91.4	80.1	58.1	84.2
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	96.8	84.1	87.6	77.4	78.2	91.4	79.2	64.8	85.9
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	97.6	86.4	89.2	81.4	82.1	88.5	84.9	75.9	81.5
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	96.8	83.7	83.2	84.5	77.8	85.9	85.2	-	88.1
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	100.0	97.5	97.0	99.1	95.0	95.3	96.8	100.0	99.4
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	97.1	86.8	89.2	-	81.3	88.5	-	49.9	90.0
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	97.0	86.3	89.9	78.2	79.8	90.4	83.3	75.9	81.5
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	99.7	89.2	83.1	89.8	83.0	87.5	86.8	61.7	90.9
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	96.7	82.0	85.3	77.4	81.7	92.5	83.9	49.4	88.1
<i>B. iriomotense</i> _EK05 ^T	96.7	84.2	88.2	78.4	79.1	91.6	84.2	45.9	83.6
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	97.6	87.1	89.1	75.0	81.1	93.1	82.6	75.9	81.5
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	99.4	86.5	85.1	84.5	82.6	89.6	86.6	60.8	88.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	99.6	90.2	83.9	85.6	81.8	88.2	87.5	60.6	90.2
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	97.7	90.0	91.6	82.0	82.4	87.8	84.5	41.8	81.5
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	97.0	86.3	86.2	78.4	84.3	87.8	82.3	44.5	82.6
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T	98.7	88.2	88.2	79.0	81.3	94.0	86.2	51.3	88.1
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	97.3	86.2	85.4	85.6	75.5	86.1	85.4	-	-
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	97.7	88.1	89.9	81.2	77.6	87.2	82.2	75.9	81.5
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	100.0	93.7	97.0	99.6	98.5	95.0	97.2	89.8	90.2
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	99.7	86.7	83.5	85.6	82.8	88.3	86.9	60.0	90.2
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	99.3	89.2	83.0	85.6	82.3	84.1	85.7	61.7	92.0
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	97.1	85.8	89.4	77.7	79.8	90.4	80.1	60.9	82.9
<i>B. yuanningense</i> CCBAU 10071 ^T	97.2	87.9	87.8	80.2	83.4	94.0	85.4	75.0	83.8
<i>B. embrapense</i> CNPSO 2833 ^T	99.8	92.3	96.0	96.7	96.8	95.7	95.2	69.9	90.9
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	97.1	88.1	89.6	79.4	83.7	86.7	81.7	-	76.4
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	97.3	90.5	87.5	83.5	81.6	86.6	83.1	-	93.9
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	96.1	84.8	89.1	78.3	85.4	90.2	88.6	77.2	86.0
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	99.8	91.3	85.0	85.3	73.1	85.7	84.3	60.9	92.0
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	96.5	86.0	86.3	84.6	85.8	91.5	85.9	77.2	84.8
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	97.5	85.3	85.6	80.5	83.4	93.0	84.8	83.7	88.0
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	99.8	93.5	91.1	94.5	90.4	-	-	68.3	85.2
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	97.8	98.9	95.6	99.3	97.7	-	-	96.2	96.4
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	97.3	84.7	90.5	77.8	80.9	90.4	83.5	75.9	81.5
<i>B. tropiciagri</i> CNPSO 1112 ^T	99.6	94.8	96.7	97.6	94.6	95.6	95.5	70.5	91.4
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	99.8	96.3	95.9	97.5	94.9	92.7	95.3	-	78.3
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	97.5	86.0	87.0	82.0	83.5	91.3	84.8	79.6	86.6
<i>B. americanum</i> CMVU 44 ^T	97.6	86.5	-	-	82.6	88.4	-	44.0	79.6
<i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T	97.4	86.3	-	-	80.6	-	-	78.8	-
<i>B. centrosemae</i> A9 ^T	97.3	90.4	-	-	80.1	88.0	-	69.9	82.3
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	97.2	92.6	89.3	78.0	80.0	91.1	83.9	43.8	78.3
<i>B. lupini</i> USDA 3051 ^T	97.3	87.4	-	51.6	78.2	-	-	56.5	-
<i>B. shewense</i> ERR11 ^T	97.7	89.1	91.2	80.4	78.3	87.2	83.2	-	-
<i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T	96.7	83.9	-	-	84.1	89.1	-	77.0	-
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	98.3	86.4	87.7	80.4	83.5	91.9	86.1	53.4	90.7
<i>B. brasilense</i> UFLA 03-321 ^T	100.0	92.3	96.3	99.6	99.4	94.4	97.3	72.8	90.8
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	99.9	92.1	92.5	95.7	92.3	95.9	94.0	46.5	74.9
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	99.7	88.5	87.0	88.7	81.0	89.2	87.0	62.3	90.9
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	97.3	88.8	88.8	80.1	82.3	88.6	83.9	-	-
<i>B. ripae</i> WR4 ^T	100.0	94.9	95.2	97.8	-	-	-	72.2	-
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	99.7	91.4	84.1	85.3	77.7	88.0	85.3	60.9	92.6
<i>B. frederickii</i> CNPSO 3426 ^T	97.3	89.0	87.0	82.3	81.1	88.0	83.9	80.0	87.8

<i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T	97.3	88.0	88.7	80.4	82.7	85.4	82.7	76.4	83.5
<i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T	97.1	91.2	87.8	78.7	83.7	87.3	81.9	40.4	76.4
<i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	96.2	87.4	90.0	82.5	82.4	91.7	86.3	79.8	87.2
<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T	97.6	82.8	89.6	78.8	79.3	86.4	82.0	-	-
<i>B. amphicarphae</i> 39S1MB ^T	97.6	82.7	88.5	78.7	78.5	87.2	81.7	-	92.6
<i>B. uaiense</i> UFLA03-164 ^T	99.6	95.5	96.4	93.8	94.5	94.7	93.9	71.6	91.4
<i>B. ivorensis</i> CI-1B ^T	99.8	91.6	93.9	93.3	93.7	87.8	92.5	93.2	96.4
<i>B. niftali</i> CNPSo 3448 ^T	97.3	84.0	90.1	77.3	80.7	87.8	82.6	-	87.8
<i>B. campsiandrae</i> UFLA01-1174 ^T	96.9	91.9	90.0	79.1	78.8	88.6	82.8	-	93.3
<i>B. archetypum</i> WSM 1744 ^T	99.3	88.2	87.0	90.5	81.5	89.4	87.8	62.3	90.9
<i>B. australiense</i> WSM 1791 ^T	99.5	89.3	83.8	85.3	82.4	88.3	87.4	62.3	89.0
<i>B. murdochi</i> WSM 1741 ^T	99.5	89.6	82.9	90.6	82.6	86.1	86.3	61.1	89.6
<i>B. thioxidans</i> DSM 9653 ^T	91.6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. elkanii</i> SEMIA 587	-	-	-	-	-	-	-	99.3	100.0
<i>B. elkanii</i> SEMIA 5019	-	-	-	-	-	-	-	100.0	100.0
<i>B. diazoefficiens</i> SEMIA 5080	-	-	-	-	-	-	-	75.9	81.5
<i>B. japonicum</i> SEMIA 5079	-	-	-	-	-	-	-	75.9	81.5
<i>B. brasilense</i> sv. <i>sojae</i> UFLA06-13	-	-	-	-	-	-	-	100.0	98.8
<i>B. brasilense</i> sv. <i>sojae</i> UFLA06-15	-	-	-	-	-	-	-	100.0	98.8
<i>B. brasilense</i> sv. <i>sojae</i> UFLA06-19	-	-	-	-	-	-	-	100.0	98.8
<i>B. brasilense</i> sv. <i>sojae</i> UFLA06-22	-	-	-	-	-	-	-	100.0	98.8

* Concatenation of the genes *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII*, and *atpD*.

Table S3. Main phenotypic characteristics of UFLA06-05^T and UFLA06-06 strains

Characteristics	UFLA06-05 ^T	UFLA06-06
Growth at 37°C	-	W
pH 4.0 to pH 10	+	+
NaCl 0.75%	W	W
C source utilization		
D-fructose	+	+
Glycine	-	-
L- Glutamic acid	+	W
Maltose	-	-
Mannitol	+	+
Sucrose	-	-
N assimilation		
L (-) Asparagine	+	+
Casein hydrolysate	+	+
L (-) Cysteine	-	-
L (-) Methionine	W	W
Enzymatic activity		
Urease	+	+
Tolerance to antibiotics:		
Amp 10	R	R
Ery 15	R	R
Kan 30	S	S
Dox 30	R	R

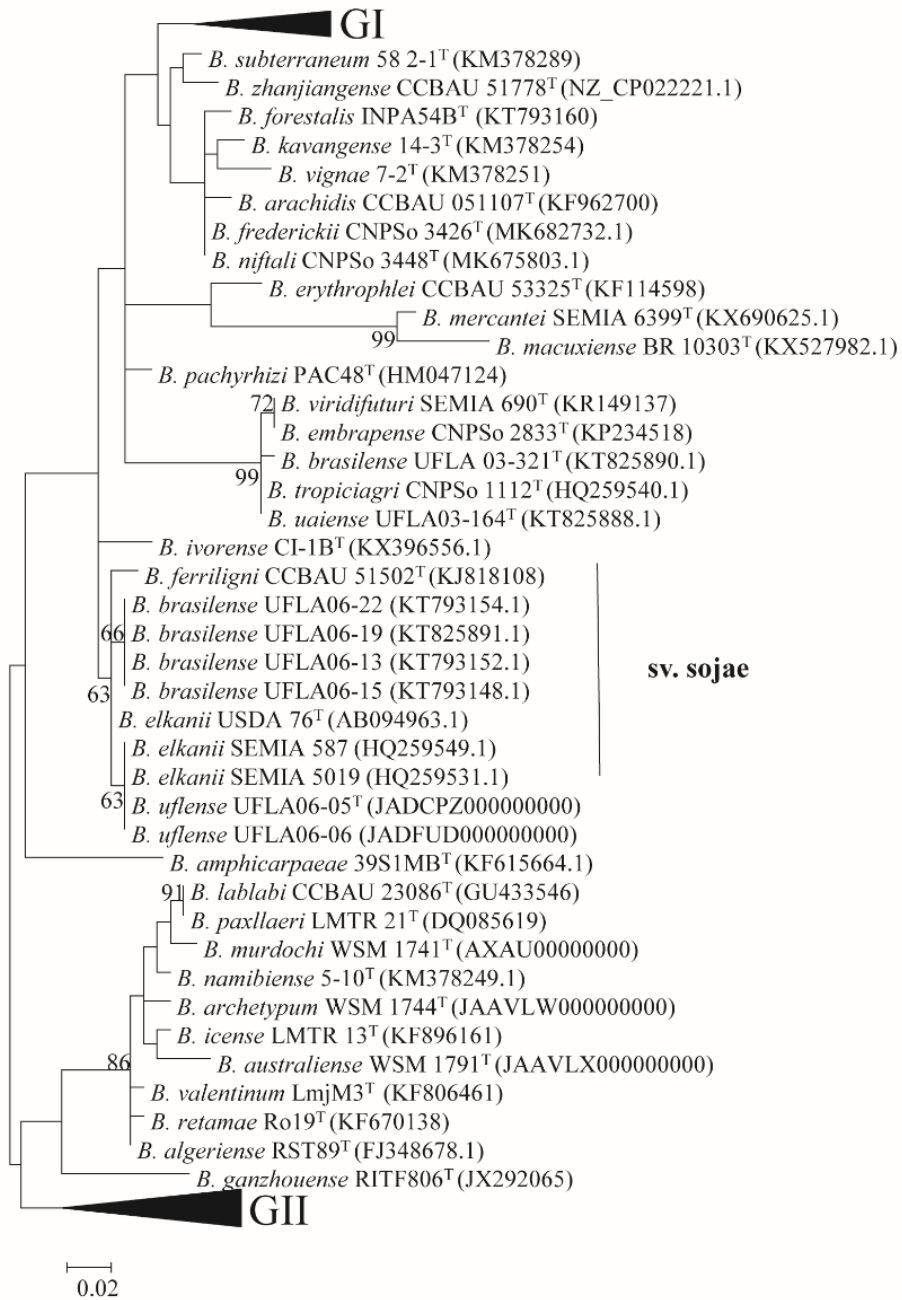
+ growth, - not growth, - W - weakly positive. For antibiotics, R – resistant, S- susceptible.

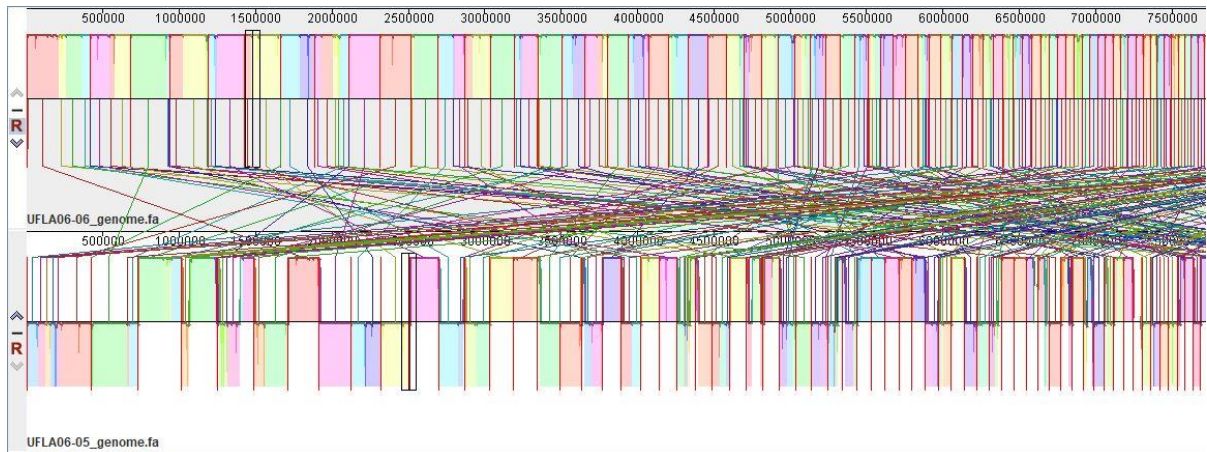
Table S4. Groups of *Bradyrhizobium* species (type strains) in the phylogenetic trees of 16S rRNA, MLSA (multilocus sequence analysis) *nodC*, and *nifH* genes

16S rRNA	GI	<i>B. centrosemae</i> A9 ^T , <i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T , <i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T , <i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T , <i>B. frederick</i> CNPSo 3426 ^T , <i>B. betae</i> LMG21987 ^T , <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T , <i>B. niftali</i> CNPSo 3448 ^T , <i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T , <i>B. rifense</i> CTAW71 ^T , <i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T , <i>B. manausense</i> BR 3351 ^T , <i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T
	GII	<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T , <i>B. amphicarpae</i> 39S1MB ^T , <i>B. ottawaense</i> OO99 ^T , <i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T , <i>B. lupini</i> USDA 3051 ^T
	GIII	<i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T , <i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T , <i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T , <i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T , <i>B. kavangense</i> 14-3 ^T , <i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T , <i>B. ingae</i> BR 10250 ^T , <i>B. iriomotense</i> EK05 ^T , <i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T
MLSA	GI	<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T , <i>B. rifense</i> CTAW71 ^T , <i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T , <i>B. betae</i> LMG 21987 ^T , <i>B. japonicum</i> USDA6 ^T , <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T , <i>B. niftali</i> CNPSo 3448 ^T , <i>B. ottawaense</i> OO99 ^T , <i>B. shewense</i> ERR11 ^T , <i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T , <i>B. amphicarpaceae</i> 39S1MB ^T , <i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T , <i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T , <i>B. campsiandrae</i> UFLA01-1174 ^T , <i>B. manausense</i> BR 3351 ^T , <i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T , <i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T
	GII	<i>B. retamae</i> Ro19 ^T , <i>B. murdochi</i> WSM 1741 ^T , <i>B. icense</i> LMTR 13 ^T , <i>B. australiense</i> WSM 1791 ^T , <i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T , <i>B. jicamae</i> PAC68 ^T , <i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T
<i>nodC</i>	GI	<i>B. diazoefficiens</i> SEMIA 5080, <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079, <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T , <i>B. ottawaense</i> OO99 ^T , <i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T , <i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T , <i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T , <i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T , <i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T , <i>B. centrosemae</i> A9 ^T , <i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T
	GII	<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T , <i>B. manausense</i> BR 3351 ^T , <i>B. americanum</i> CMVU44 ^T , <i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T , <i>B. ingae</i> BR 10250 ^T , <i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T , <i>B. jicamae</i> PAC68 ^T
	GIII	<i>B. archetypum</i> WSM 1744 ^T , <i>B. australiense</i> WSM 1791 ^T , <i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T , <i>B. algeriense</i> RST89 ^T , <i>B. retamae</i> Ro19 ^T , <i>B. icense</i> LMTR 13 ^T , <i>B. namibiense</i> 5-10 ^T , <i>B. murdochi</i> WSM 1741 ^T , <i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T , <i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T
<i>nifH</i>	GI	<i>B. japonicum</i> SEMIA 5079, <i>B. diazoefficiens</i> SEMIA 5080, <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T , <i>B. ottawaense</i> OO99 ^T , <i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T , <i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T , <i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T , <i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T , <i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T , <i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T , <i>B. centrosemae</i> A9 ^T
	GII	<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T , <i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T , <i>B. campsiandrae</i> UFLA01-174 ^T , <i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T , <i>B. rifense</i> CTAW71 ^T , <i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T , <i>B. neotropiale</i> BR10247 ^T , <i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T , <i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T , <i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T , <i>B. jicamae</i> PAC 68 ^T , <i>B. ingae</i> BR 10250 ^T , <i>B. iriomotense</i> EK05 ^T , <i>B. manausense</i> BR 3351 ^T , <i>B. americanum</i> CMVU44 ^T , <i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T

Fig. S1 Maximum likelihood phylogeny based on *nifH* gene sequence (171 bp) showing the relationship between strains of the novel species (shown in bold) and type strains of the *Bradyrhizobium* species. Bootstrap values greater than 50% are indicated at nodes. *Bar*, 2 substitutions per 100 nucleotides positions. Gene accession numbers for each strain are given in parentheses.

Fig S2. Comparison of the genomes of strains UFLA06-05^T and UFLA06-06. Colored blocks in the first genome are connected by lines to similarly colored blocks in the other genome. These lines indicate which regions in each genome are homologous.





Score assembly of the UFLA06-05^T and UFLA06-06 genomes:

Number of Contigs: 146
 Number reference replicons: 178
 Number of assembly bases: 9110918
 Number of reference bases: 9016501
 Number of LCBs: 248
 Number of Blocks: 178
 Breakpoint Distance: 110
 DCJ Distance: 93
 SCJ Distance: 220
 Number of Complete Coding Sequences: 0
 Number of Broken Coding Sequences: 0
 Number of SNPs: 2383
 Number of Gaps in Reference: 384
 Number of Gaps in Assembly: 429
 Total bases missed in reference: 29952
 Percent bases missed: 0,3322 %
 Total bases extra in assembly: 128999
 Percent bases extra: 1,4159 %
 Number of missing chromosomes: 13
 Number of extra contigs: 7
 Number of Shared Boundaries: 0
 Number of Inter-LCB Boundaries: 236
 Contig N50: 111108
 Contig N90: 503
 Min contig length: 503
 Max contig length: 426738
 Substitutions (Ref on Y, Assembly on X):

	A	C	T	G
A	-	179	121	331
C	155	-	252	158
T	105	318	-	189
G	263	127	125	-

ARTIGO 05 – Filogenia de genes relacionadas a fixação biológica de nitrogênio em 38 estirpes de *Bradyrhizobium* spp. simbiotes de *Glycine max* L., *Arachis pintoi* e *Phaseolus lunatus* L.

Artigo de acordo com as normas da revista Archives of Microbiology

1 **Filogenia de genes relacionadas a fixação biológica de nitrogênio em 38 estirpes de *Bradyrhizobium* spp.**
2 **simbiontes de *Glycine max* L., *Arachis pintoi* e *Phaseolus lunatus* L.**

3
4 Daniele Cabral Michel¹ (ORCID: 0000-0001-8347-1956), Teotonio Soares de Carvalho¹ (ORCID: 0000-0001-
5 6631-5177), Konstantinos T. Konstantinidis² (ORCID: 0000-0002-0954-4755), Fatima Maria de Souza
6 Moreira^{1*} (ORCID: 0000-0003-0159-5811)

7

8 ¹Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade
9 Federal de Lavras, Campus UFLA, 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

10 ²Professor da Georgia Institute of Technology, Laboratório de Genômica Microbiana Ambiental, Georgia, Estados
11 Unidos

12

13 **Resumo**

14 Para identificação e análise filogenética de genes relacionados a fixação biológica de nitrogênio (FBN) foram
15 sequenciados os genomas de 38 estirpes de *Bradyrhizobium* oriundas de diferentes regiões brasileiras e simbiontes
16 de três diferentes leguminosas: amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), soja (*Glycine max* L.) e feijão-fava
17 (*Phaseolus lunatus*). O objetivo desse estudo foi entender a essencialidade de 14 genes *nif* e 2 genes *fix* na FBN
18 e a relação desses genes na eficiência da fixação biológica de N₂. Além disso, compreender a interação dos
19 posicionamentos filogenéticos das estirpes em 7 genes *nif* e os 2 genes *fix* com as origens geográficas e plantas
20 hospedeiras. Foram construídas árvores filogenéticas para os genes *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK*, *nifN* e para
21 os genes *fixJL*. A filogenia dos genes *nif* mostrou que as estirpes se agruparam em função de suas plantas
22 hospedeiras. Nas análises filogenéticas dos genes *fix*, as estirpes mantiveram alguns agrupamentos encontrados
23 nos genes *nif*, embora tenham formado novos grupos (como os encontrados) em estirpes de soja e feijão-fava.
24 Observou-se que as estirpes testadas e simbiontes de cada uma das espécies de leguminosas mostraram história
25 evolutivas similares entre elas com relação aos genes relacionados a FBN.

26

27

28 **Palavras-chave:** Genes, análise filogenética, FBN

29

30

31 **Introdução**

32 O nitrogênio (N) é um elemento essencial para a formação de compostos como o DNA e proteínas das
33 células de todos os organismos vivos. Nas plantas, inclusive, é um componente da clorofila que desempenha um
34 papel importante no processo da fotossíntese (EVANS; CLARCK, 2019). No entanto, sua forma mais abundante
35 na atmosfera é na forma de gás N₂, não assimilável pelas plantas. Para que seja assimilado por elas precisa ser
36 convertido a formas assimiláveis como NH₃⁺. Essa conversão do N₂ pode ser realizada biologicamente pela
37 enzima nitrogenase presente em algumas espécies bacterianas pertencentes a diferentes grupos filogenéticos .

38 Dentre os organismos capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) está o grupo dos
39 rizóbios. Este é composto por bactérias dos filos Alfa e Beta-Proteobacteria capazes de estabelecer simbiose com
40 leguminosas. Na classe Alfaaproteobactérias, estão os organismos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Este
41 grupo de organismos é bastante importante pois forma simbiose com diferentes e importantes culturas como a
42 soja (XU et al., 1995; DELAMUTA et al., 2013), feijão-fava (DURÁN et al., 2014; COSTA et al., 2017;
43 RODRIGUES et al., 2021), amendoim (STEENKAMP et al., 2008) e várias espécies florestais tropicais
44 (MOREIRA et al., 1993; RAMÍREZ -BAHENA et al., 2009; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2013; DELAMUTA et al.,
45 2015), entre outras.

46 A fixação simbiótica de N₂ demanda a interação coordenada de duas classes principais de genes presentes
47 em rizóbios, os genes *nif* e *fix* (SHAMSELDIN 2013). Os genes *nif* codificam para as duas proteínas que
48 constituem a nitrogenase (dinitrogenase e dinitrogenase redutase) e para as proteínas que sintetizam o cofator ferro-
49 molibdênio. Já os genes *fix* codificam proteínas fornecedoras de elétrons (flavoproteínas ou ferredoxinas)
50 (FISCHER 1994). Embora as funções dos genes *nif* e *fix* já sejam bem definidas em nível bioquímico, ainda é
51 difícil definir o número exato e quais genes são necessários para que a atividade da nitrogenase aconteça nos
52 diferentes organismos fixadores de N₂ (FISCHER 1994; OLDROY; DIXON 2014).

53 Por isso, estudos para a identificação dos diferentes genes *nif* e *fix* relacionados a FBN, permitem
54 relacionar quais genes podem ser essenciais para a FBN em gêneros de bactérias eficientes como o gênero
55 *Bradyrhizobium*. Além disso, o estudo filogenético das sequências desses genes explica como eles interagem com
56 as leguminosas. Por exemplo, se o seu processo evolutivo pode estar relacionado a planta hospedeira ou à algum
57 mecanismo como a transferência horizontal de genes. Através do estudo desenvolvido por Masson-Boivin et al.
58 (2009) observou-se que contrário as expectativas, existia uma variação no número de genes *nif* em rizóbios. Isso
59 pode ser uma evidência de que diferentes gêneros e espécies do grupo de rizóbios recrutam diferentes genes para
60 o processo de fixação biológica de nitrogênio. Estudo filogenéticos com o gene *nifH* mostraram que esse gene

61 apresenta uma origem monofilética e que pode ter se espalhado entre estirpes de *Bradyrhizobium* através de
62 transferência vertical e horizontal (MENNA et al., 2011) e que não só esse, mas como os genes *nifDK* e *nifENB*
63 apresentam filogenia muito similar indicando que esses genes coevoluiram (KOIRALA; BRÖZEL, 2021)

64 Dessa forma, buscou-se identificar a presença de genes *nif* e *fix* nos 38 genomas de estirpes de
65 *Bradyrhizobium* spp. oriundas de diferentes regiões brasileiras e simbioses de três leguminosas (*Arachis pintoi*,
66 *Glycine max* L. e *Phaseolus lunatus*) e a relação filogenética deles com a eficiência na FBN. Além disso, verificar
67 se o posicionamento das estirpes em estudo, nas árvores filogenéticas, se daria em função da origem geográfica
68 ou da planta hospedeira.

69

70 **Material e métodos**

71 **Origem das estirpes**

72 As estirpes selecionadas para este estudo foram isoladas de nódulos de amendoim forrageiro e soja,
73 comprovadamente capazes de nodular essas espécies em condições axênicas (SÁ et al., 2019; RIBEIRO et al 2015)
74 . O grupo de estirpes oriundas do feijão-fava compreende as estirpes isoladas dessa espécie em condições axênicas
75 (RODRIGUES et al., 2021) e aquelas capazes de formar nódulos nesta planta, isoladas de outras espécies de
76 leguminosas (COSTA et al., 2017). A origem geográfica das estirpes capazes de nodular cada leguminosa é
77 mostrada na Tabela 1. O isolamento e caracterização das estirpes foram feitos em meio 79 (FRED; WAKSMAN
78 1928). Todas as estirpes em estudo se encontram depositadas na coleção de bactérias do Setor de Biologia do Solo,
79 Microbiologia e Processos Biológicos na UFLA. As bactérias selecionadas com alta eficiência do amendoim
80 forrageiro foram: **UFLA05-112, UFLA 05-111, UFLA05-98, UFLA05-153, UFLA05-158, UFLA05-126,**
81 **UFLA05-150, UFLA0-596;** da soja **UFLA06-24, UFLA06-12, UFLA06-28, UFLA06-29, UFLA06-07,**
82 **UFLA06-03, UFLA06-42;** do feijão-fava: **UFLA02-195, UFLA02-199, UFLA02-206, UFLA02-221, UFLA03-**
83 **144, INPA86A, UFLA02-242;** As bactérias selecionadas com baixa eficiência para o amendoim forrageiro:
84 UFLA05-109, UFLA05-129, UFLA05-108, UFLA05-89, UFLA05-125; ; para a soja: UFLA06-11, UFLA 06-06,
85 UFLA 06-40, UFLA 06-05, UFLA 06-37, UFLA 06-26 para o feijão-fava UFLA02-208, UFLA 02-213, UFLA02-
86 259, INPA237B, UFLA 03-320; para a soja: UFLA06-11, UFLA 06-06, UFLA 06-40, UFLA 06-05, UFLA 06-
87 37, UFLA 06-26.

88 Sequenciamento dos genomas

89 Inicialmente as estirpes foram crescidas em meio 79 por 4-5 dias. Em seguida, uma alíquota de uma
90 alíquota de 1 mL do meio de cultivo de cada uma das 38 estirpes selecionadas para este estudo foi transferida para
91 microtubos para a extração de DNA, de acordo com o protocolo do kit de Purificação de DNA Wizard® da
92 Promega. O preparo da biblioteca de DNA genômico foi realizado utilizando o kit de biblioteca NexteraXT
93 (Illumina, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade final da biblioteca foi medida através de
94 KAPA SYBR® FAST qPCR com o sistema QuantStudio® 5 (Applied Biosystems, CA, USA). A biblioteca foi
95 avaliada pelo TapeStation HSD1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, USA). Os índices Illumina® 8-nt
96 dual foram usados. Baseado em valores de controle de qualidade, a junção equimolar de bibliotecas foi realizado
97 e as leituras dos fragmentos foram feitas em dois sentidos (2x150 bases) na plataforma Illumina® HiSeq X
98 (Illumina, CA, EUA). A montagem dos genomas foi realizada através do algoritmo SPADes 3.13.0 (BANKEVICH
99 et al. 2012) e a qualidade e completude dos genomas foram checadas através do CheckM 1.0.18 (PARKS et al.
100 2015).

101

102 Anotação genômica

103 A identificação dos genes relacionados a fixação biológica de nitrogênio, ou seja, genes relacionados a
104 síntese, processamento e montagem do complexo nitrogenase, foi realizada a partir da anotação dos genomas das
105 38 estirpes. Para o processo de anotação foi utilizado o programa RAST (AZIZ et al. 2008) dentro da plataforma
106 Kbase (<https://www.kbase.us/>). Através do RAST, foram encontrados os genes *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK* e
107 *nifN*, *fixJ* e *fixL*. O processo de anotação consistiu na busca dos nomes das enzimas as quais os genes são
108 responsáveis pela codificação ou diretamente através da escrita do nome do próprio gene, “*nif*”, por exemplo,
109 mais a letra correspondente a uma determinada função do gene, por exemplo *nifA* ou *nifH*. As sequências da
110 proteína sintetizada por cada gene *nif* das 38 estirpes foram selecionadas para análises posterior na plataforma
111 BLAST (Basic Local Alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), opção Blastp (proteína →
112 proteína). O objetivo desse procedimento é identificar com quais sequencias do banco de dados do BLAST são
113 mais idênticas e o quanto são idênticas (em porcentagem) as sequencias em estudodisso, ao entrar no código de
114 acesso do gene do organismo mais próximo à sequência em estudo, é possível confirmar na base de dados Uniprot
115 (<https://www.uniprot.org/>) se a sequência mais próxima encontrada é de fato do gene que se está procurando. A
116 partir desta confirmação, a sequência de cada gene foi incluída na análise filogenética. As sequências dos genes

117 *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifK*, *nifH*, *nifN*, *fixJ* e *fixL* das espécies descritas de *Bradyrhizobium* quando não
118 encontradas no Banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foram retiradas dos
119 seus respectivos genomas utilizando a plataforma kbase. O código de acesso dos genes e genomas constam na
120 tabela S1. Para os genes *nifA* foram utilizadas 50 estirpes tipo de *Bradyrhizobium* já descritas. Já para o gene *nifB*,
121 53 estirpes tipo e para os genes *nifD*, *nifE*, *nifK*, *nifN* 54 estirpes. As filogenias dos genes *fixJL* foram construídas
122 com 49 estirpes tipo de espécies descritas de *Bradyrhizobium*.

123 Os genes *nif* e *fix* que não foram encontrados nas estirpes em estudo e nas estirpes tipo das espécies de
124 *Bradyrhizobium* já descritas podem não ter sido achados devido ao processo de anotação utilizado. Dessa forma,
125 não significa, necessariamente, que estes genes estão ausentes nesses genomas.

126

127 **Filogenia dos genes *nif* e *fix***

128 Os genes *nif* e *fix* são envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio, especificamente na
129 síntese, processamento e montagem do complexo nitrogenase (REMIGI et al. 2016). Existem diversos genes
130 pertencentes aos grupos dos genes *nif* e *fix* dentre eles estão os genes *nifABHDKEN* e os genes *fixJ* e *fixL* que
131 tiveram suas sequências obtidas dos genomas das estirpes em estudo. Os genes selecionados para esse estudo são
132 alguns dos diversos genes *nif* e *fix* que possuem funções essenciais para que a fixação simbiótica de nitrogênio
133 ocorra. Em seguida, essas sequências foram alinhadas junto das sequências das estirpes tipo das espécies de
134 *Bradyrhizobium* já descritas, usando o Muscle (EDGAR 2004). Posteriormente as sequências foram cortadas e
135 as filogenias foram construídas utilizando o pacote do programa MEGA 7 (KUMAR et al. 2016). A árvore
136 filogenética de cada um dos genes foi feita utilizando os métodos estatísticos neighbor joining (NJ) (SAITOU and
137 NEI 1987) e maximum likelihood (ML) (FELSENSTEIN 1981). Foi utilizado o bootstrap de 1000 nos dois
138 métodos utilizados. Os modelos de distância para as árvores dos genes *nifA*, *nifD*, *nifH* e *fixJ*, construídas foi
139 Tamura 3-parameter model (TAMURA 1992). Já para as árvores dos genes *nifB*, *nifE*, *nifK*, *nifN*, *fixL* o melhor
140 modelo encontrado foi General Time Reversible (GTR) (NEI; KUMAR, 2000). As sequências dos genes
141 *nifABHDKEN* e *fixJL* foram avaliadas isoladamente. As árvores construídas a partir do método *neighbor joining*
142 apresentaram resultados semelhantes ao ML, mas não constam neste trabalho.

143

144 **Resultados e discussão**

145 **Genes *nif***

146 Os genes relacionados a FBN pesquisados nos genomas das 38 estirpes selecionadas para esse estudo
147 foram *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK*, *nifN*, *nifX*, *nifZ*, *nifQ*, *nifL*, *nifT*, *nifW* (Tabela 2). Os genes *nifF*, *nifL* e
148 *nifT* não foram encontrados nos genomas. O gene *nifW* não foi achado nas estirpes UFLA 05-112, UFLA05-111,
149 UFLA05- 98 e UFLA05-89 isoladas de amendoim forrageiro e na estirpe UFLA02-259 isolada de feijão-fava.

150 Dentre as estirpes provenientes das três diferentes leguminosas, aquelas oriundas do amendoim forrageiro
151 e da soja formaram grupos consistentes ao longo das árvores dos dez genes *nif* avaliados, ou seja, as mesmas
152 estirpes formaram os mesmos grupos (Fig. 1-3; Fig. S1-S4). Já as estirpes simbiotes de feijão-fava apresentaram
153 posicionamentos distribuídos, dispersos ao longo das árvores.

154

155 **Genes *fix***

156 Os genes *fixJ* e *fixL* foram encontrados em todas as 38 estirpes estudadas. Com relação aos dois genes *fix*
157 analisados as estirpes do amendoim forrageiro formaram apenas um grupo. As estirpes de soja apresentaram a
158 formação de novos grupos antes não formados na filogenia do gene *nif* e as estirpes de feijão-fava se mantiveram
159 dispersas ao longo das árvores (Fig. 4-5). Vale ressaltar que nas árvores dos genes *fixJL* as estirpes UFLA06-42,
160 UFLA06-29, UFLA06-07, UFLA06-03 provenientes da soja e as estirpes UFLA02-242, UFLA02-206, UFLA02-
161 221, UFLA02-195 e UFLA02-199 oriundas de feijão-fava se posicionaram dentro de um mesmo grupo, diferente
162 dos resultados encontrados na filogenia dos genes *nif*.

163

164 **Filogenia dos genes *nif* e *fix* dos simbiotes do amendoim forrageiro**

165 As estirpes isoladas de amendoim forrageiro formaram grupos semelhantes nas árvores filogenéticas dos
166 genes *nifA*, *nifB*, *nifK*, *nifN*, *nifQ*, *nifX* e *nifZ* onde as estirpes UFLA05-98, UFLA05-109 oriundas da Bahia e
167 UFLA05-150 isolada em Minas Gerais formaram um grupo (Fig. 1-2; FigS3-S4), exceto nos genes *nifH* e *nifQ*. A
168 estirpe UFLA05-150 não foi avaliada com relação aos genes *nifD* e *nifE*, pois as suas sequências não se alinharam
169 adequadamente com as demais sequências utilizadas para a construção das árvores filogenéticas. O outro grupo
170 formado pelas estirpes de amendoim forrageiro compreende: UFLA05-126, UFLA05-125, UFLA05-129,

171 UFLA05-108, UFLA 05-112, UFLA 05-96, UFLA05-111 e UFLA05-89 , isoladas da Bahia e a UFLA05-153 e
 172 UFLA05-158 isoladas de Minas Gerais, exceto no gene *nifK* no qual a estirpe UFLA05-158 não foi inserida na
 173 análise devido ao não alinhamento da sequência nucleotídica do gene. A estirpe UFLA05-109 se agrupou com as
 174 dez estirpes citadas acima, no gene *nifH* e *nifQ* (Fig. S2 e Fig. S5). Dentro deste grupo de dez estirpes , observou-
 175 se a formação de subclados nas árvores dos genes *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK* e *nifN*, *nifX* e *nifZ* (Fig. 1-3;
 176 FigS1-S7). Na filogenia dos genes *fixJL* todas as estirpes isoladas do amendoim forrageiro formaram um único
 177 grupo (Fig. 4-5).

178

179 **Filogenia dos genes *nif* e *fix* dos simbiossitos de soja**

180 Com relação as estirpes simbiossitos de soja,observou-se a formação de dois grupos nas árvores filogenéticas dos
 181 genes *nifA*, *nifD*, *nifE*, *nifK*, *nifH* e *nifN*, *nifQ*, *nifX* e *nifZ*. O primeiro grupo é composto pelas estirpes UFLA06-
 182 12, UFLA06-05, UFLA06-06, UFLA06-07, UFLA06-03, UFLA06-11 isoladas de Minas Gerais e UFLA06-26,
 183 UFLA 06-28 e UFLA06-29, isoladas do Piauí e UFLA06-42 de Santa Catarina (Figs. 1-3; Fig. S1-S7). O segundo
 184 grupo foi formado pelas estirpes UFLA06-24 oriunda do Piauí e UFLA06-37 e UFLA06-40 isoladas de Mato
 185 Grosso do Sul, em todas as filogenias do gene *nif*. Os mesmos dois grupos foram formados na filogenia do gene
 186 *nifB*, exceto a estirpe UFLA06-26 que foi retirada devido ao não alinhamento as demais sequencias utilizadas na
 187 árvore filogenética. Na filogenia do gene *nifN* embora as estirpes UFLA06-12 e UFLA06-26 estejam dentro do
 188 mesmo grupo das demais oito estirpes, formaram um subclado dentro do grupo. As estirpes tipos de *B. daqingense*
 189 CCBAU 15774^T (WANG et al., 2013), *B. huanghuaihaiense*_CCBAU_23303^T (ZHANG et al. 2012), *B.*
 190 *japonicum* USDA 6^T (JORDAN, 1982), *B. diazoefficiens* USDA 110^T (DELAMUTA et al., 2013) e *B. ottawaense*
 191 OO99^T (YU et al.,2014), mostraram um posicionamento muito próximo as estirpes UFLA06-24, UFLA06-37 e
 192 UFLA06-40 nos genes *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifK* e *nifN*, *nifX* e *nifZ*. Na filogenia do gene *nifH*, a estirpe tipo *B.*
 193 *liaoningense* LMG 18230^T (XU et al. 1995) ficou dentro deste grupo. Com relação aos dois genes *fix*, as estirpes
 194 apresentaram posicionamentos diferentes dos encontrados nos genes *nif*. A estirpe UFLA06-24 não se agrupou as
 195 estirpes UFLA06-37 e UFLA06-40 , posicionou-se em outro clado (Figs. 4-5). O grupo formado pelas 10 estirpes
 196 isoladas da soja na filogenia dos genes *nif*, foi dividido em dois grupos em ambos os dois genes *fix* (Fig. 4-5). O
 197 primeiro composto pelas estirpes UFLA06-05, UFLA06-26, UFLA06-06, UFLA06-12, UFLA06-28. O segundo
 198 pelas estirpes UFLA06-11, UFLA06-42, UFLA06-29, UFLA06-07, UFLA06-03.

199

200 **Filogenia dos genes *nif* e *fix* dos simbioss de feijão-fava**

201 As estirpes testadas em feijão-fava mostraram posicionamentos bem distribuídos ao longo das árvores
 202 filogenéticas dos genes *nif*. Foi possível observar a formação de grupos como o formado pelas estirpes INPA86A
 203 isoladas da Amazônia e UFLA02-208 do Piauí na filogenia dos genes *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK* e *nifN*,
 204 *nifQ*, *nifX* e *nifZ*. Na filogenia dos genes *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK*, *nifN* as estirpes INPA327B, UFLA03-
 205 144 isoladas na Amazônia e UFLA03-320 isolada em Minas Gerais formaram um grupo. As estirpes UFLA02-
 206 195, UFLA02-199, UFLA02-221, UFLA02-206 e UFLA02-242 isoladas no Piauí agruparam-se nas árvores
 207 filogenéticas dos genes *nifA*, *nifD*, *nifK*, *nifH*, *nifN*, *nifQ*, *nifX* e *nifZ* formando subclados. Um deles formado
 208 pelas estirpes UFLA02-195, UFLA02-199 e UFLA02-221 e o outro pelas duas outras estirpes UFLA02-206 e
 209 UFLA02-242. Esta última estirpe não foi inserida na filogenia do gene *nifE*. As estirpes UFLA02-213 e UFLA02-
 210 259 se posicionaram separadamente de todas as estirpes testadas em feijão-fava na filogenia dos dez genes *nif*
 211 avaliados. Com referência as árvores filogenéticas dos genes *fixJL*, as estirpes UFLA02-195, UFLA02-199,
 212 UFLA02-221, UFLA02-206 e UFLA 02-242 formaram um grupo com a formação de subclados (Fig. 4). Em
 213 ambos os genes *fix* avaliados, a estirpe UFLA03-320 se posicionou separadamente das demais estirpes testadas
 214 em feijão-fava e as estirpes UFLA02-213 e UFLA02-259 se agruparam. Na filogenia do gene *fixJ*, as estirpes
 215 UFLA03-144 e INPA237B também formaram um grupo. Assim como as estirpes INPA86A e UFLA02-208. Na
 216 árvore filogenética do gene *fixL*, as estirpes INPA86A e UFLA02-208 se posicionaram separadamente, bem como
 217 as estirpes UFLA03-144 (Fig. 5). A estirpe INPA237B não foi inserida na filogenia deste gene.

218 Diversas hipóteses foram levantadas quanto aos resultados que poderiam ser encontrados com as
 219 filogenias dos genes *nif* e *fix* obtidos e analisados filogeneticamente nas 38 estirpes em estudo. A primeira delas
 220 seria se as estirpes eficientes de cada uma das leguminosas avaliadas se agrupariam na filogenia dos genes *nif*, por
 221 exemplo. Do mesmo, ocorreria com as estirpes pouco eficientes. A segunda hipótese consistia em encontrar
 222 resultados diferentes entre as estirpes, em função da presença ou ausência de genes em seus genomas, ou seja,
 223 estirpes eficientes possuíam genes que as estirpes pouco eficientes não possuiriam. O terceiro questionamento
 224 baseava-se na relação entre o posicionamento filogenético das estirpes e seus respectivos locais de origem. Seria
 225 o local de onde foram isoladas responsável pelos grupos e posicionamentos formados nas filogenias dos genes *nif*
 226 e *fix*. A última hipótese consistia em identificar se o posicionamento das estirpes em estudo, nas árvores
 227 filogenéticas, seria em função das plantas hospedeiras das quais foram isoladas.

228 A respeito do primeiro questionamento, as estirpes não se posicionaram nas árvores filogenéticas em
229 função da alta eficiência ou baixa eficiência. A estirpe de amendoim forrageiro UFLA05-111 (eficiente), por
230 exemplo, agrupou com a estirpe UFLA05-89 (pouco eficiente). As estirpes UFLA06-28, UFLA06-29, UFLA06-
231 07 (eficientes), agruparam-se com as estirpes UFLA06-06, UFLA06-05 e UFLA06-26 (pouco eficientes). Embora
232 um grupo tenha sido formado somente de estirpes eficientes de feijão-fava: UFLA02-206, UFLA02-242, UFLA02-
233 195, UFLA02-199 e UFLA02-221. Estirpes como a INPA86A (eficiente) agrupou-se a estirpe UFLA02-208
234 (pouco eficiente). Dessa forma, não é possível afirmar que os agrupamentos se deram em função da eficiência e
235 pouca eficiência das estirpes em estudo.

236 A segunda hipótese levantada estava baseada na presença ou ausência de genes *nif* e *fix* nos 38 genomas
237 analisados. A partir dos resultados encontrados (Tabela 2) não é possível estabelecer essa relação visto que os 10
238 genes *nif*, exceto o *nifW* onde algumas estirpes de amendoim forrageiro (eficientes e pouco eficientes) não
239 apresentaram o gene, e os 2 genes *fix* avaliados se mostraram presentes em todas as estirpes de *Bradyrhizobium*
240 estudadas, ou seja, os genes *nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifK*, *nifN*, *nifH*, *nifQ*, *nifX*, *nifZ*, *fixJ* e *fixL* foram encontrados
241 nos 38 genomas, resultado independente de eficiência ou pouca eficiência.

242 A respeito da terceira pressuposição, que consistia na possibilidade dos locais de origem das estirpes
243 influenciar o posicionamento delas, nas árvores filogenéticas construídas, não foi possível observá-la nos
244 resultados encontrados. Embora, estirpes de um mesmo local de origem estejam no mesmo grupo, como por
245 exemplo, a UFLA05-126 e UFLA05-125 da Bahia, outras estirpes como UFLA05-153 e UFLA05-158 de Minas
246 Gerais, também estão no mesmo grupo das duas primeiras. O mesmo acontece para as estirpes da soja. Apesar do
247 comportamento um pouco diferenciado nas estirpes de feijão-fava, pois as estirpes UFLA02-199, UFLA02-195,
248 UFLA02-242, UFLA02-206 e UFLA02-221 formaram um grupo em todas as árvores construídas nesse estudo,
249 outras estirpes de feijão-fava formaram grupos com locais de origem diferentes.

250 Por fim, a quarta hipótese referia-se ao posicionamento das 38 estirpes nas filogenias dos genes *nif* e *fix*,
251 considerando as respectivas plantas hospedeiras como responsáveis por esses posicionamentos. Nesse caso, os
252 grupos encontrados nos genes *nif* parecem estar em consonância com as respectivas plantas hospedeiras, ou seja,
253 foram formados grupos somente com estirpes da mesma planta hospedeira. Esses resultados exemplificam uma
254 possível pressão de seleção da planta hospedeira pelos seus microssimbiontes. Vale ressaltar, inclusive, que as
255 estirpes tipo de espécies já descritas, isoladas de soja como a *B. daqingense* CCBAU 15774^T, *B. huanghuaihaiense*
256 CCBAU 23303^T, *B. japonicum* USDA6^T, *B. diazoefficiens* USDA 110^T, *B. ottawaense* OO99^T e *B. liaoningense*
257 LMG 18230^T (*nifH*) se posicionaram próximas as estirpes de soja desse estudo. Esse resultado reforça que plantas

258 hospedeiras podem ter influência no aparato genético relacionado ao processo de FBN em estirpes de
259 *Bradyrhizobium*.

260

261 **Conclusão**

262 Os genes *nif* das estirpes de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava apresentaram posicionamentos
263 semelhantes em todos os dez genes avaliados (*nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK*, *nifN*, *nifQ*, *nifX* e *nifZ*). Além
264 disso, agruparam-se de acordo com suas respectivas plantas hospedeiras. Elas podem estar exercendo forte
265 influência nos posicionamentos e agrupamentos formados nas árvores dos genes *nif* e *fix* visto que os grupos
266 formados pelas estirpes foram em função de suas respectivas plantas hospedeiras. Dessa forma, o local de origem
267 das estirpes não foi capaz de determinar os posicionamentos encontrados. Com relação a filogenia dos genes *fix*
268 (*fixJ*, *fixL*), observou-se que alguns agrupamentos foram mantidos como os encontrados em algumas estirpes de
269 amendoim forrageiro, soja e feijão-fava. No entanto, nesses dois genes algumas estirpes de soja e feijão-fava
270 formaram um mesmo grupo e novos agrupamentos entre estirpes de feijão-fava foram formados. A presença e
271 ausência dos genes selecionados para esse estudo, nos 38 genomas sequenciados foi similar.

272

273 **Agradecimentos.** Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil
274 (CAPES) (CAPES/PROEX/PPGCS - 593-18) para a realização desse trabalho, ao Conselho Nacional de
275 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo: 431504/2016-4) e a Fundação de Amparo e
276 Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (CAG – RED – 00330-16) pela concessão da bolsa, financiamento de análises
277 e equipamentos utilizados.

278 **Referências**

279

280 Aziz RK, Bartels D, Best A, et al (2008) The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. BMC
281 Genomics 9:1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>

282 Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications
283 to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology 19:455–477.
284 <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

285 Costa EM, de Almeida Ribeiro PR, de Lima W, et al (2017) Lima bean nodulates efficiently with Bradyrhizobium
286 strains isolated from diverse legume species. Symbiosis 73:125–133. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0473-8>
287

288 Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, et al (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification
289 of Bradyrhizobium japonicum group Ia strains as Bradyrhizobium diazoefficiens sp. nov. Int J Syst Evol
290 Microbiol 63:3342–3351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049130-0>

291 Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, et al (2015) Bradyrhizobium tropiciagri sp. nov. and
292 bradyrhizobium embrapense sp. nov nitrogenfixing symbionts of tropical forage legumes. Int J Syst Evol
293 Microbiol 65:4424–4433. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000592>

294 Durán D, Rey L, Mayo J, et al (2014) Bradyrhizobium paxllaeri sp. nov. and Bradyrhizobium icense sp. nov.,
295 nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (Phaseolus lunatus L.) in Peru. Int J Syst Evol Microbiol
296 64:2072–2078. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.060426-0>

297 Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids
298 Res 32:1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

299 Evans JR, Clarke VC (2019) The nitrogen cost of photosynthesis. J Exp Bot 70:7–15

300 Felstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J Mol Evol 17:368-
301 376. <https://doi.org/10.1007/bf01734359>

302 Fischer H-M (1994) Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. Microbiol reviews 58:352-386.
303 <https://doi.org/10.1128%2Fmr.58.3.352-386.1994>

304 Fred EB, Waksman AS (1928). Laboratory manual of general Microbiology with special reference to the
305 microorganismos of the soil McGraw-Hill book company, Inc. New York and London

306 Guimarães AA, Jaramillo PMD, Nóbrega RSA, et al (2012) Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing
307 bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. Appl
308 Environ Microbiol 78:6726–6733. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>

309 Guimarães A.A. (2015) High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land
310 uses in Brazilian tropical ecosystems. Syst Appl Microbiol 38:433-441, 2015
311 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>

312 Jordan 1982 Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-
313 growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int J Syst Evol Microbiol, v:136-139.
314 <https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>

315 Klipp W (2004) Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria (Nitrogen Fixation: Origins,
316 Applications, and Research Progress) Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/1-4020-2179-8>
317

318 Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger
319 Datasets. Mol Biol Evol 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054>

320 Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S (2014) Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the
321 Mesorhizobium genus. Microbiol Res 169:2–17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>

- 322 López-López A, Negrete-Yankelevich S, Rogel MA, et al (2013) Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico
323 are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). *Syst Appl Microbiol* 36:33–38.
324 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.006>
- 325 Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how
326 many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 17:458–466
- 327 Moreira FMS, Gillis M, Pot B, et al (1993) Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence
328 Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins.
329 *Syst Appl Microbiol* 16:135–146. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80258-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80258-4)
- 330 Nei and Kumar 2000 Molecular evolution and phylogenetics Oxford University Press.
331
- 332 Oldroyd GED, Dixon R (2014) Biotechnological solutions to the nitrogen problem *Science Direct*
333 Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr Opin Biotechnol* 26:19–24.
334 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.006>
335
- 336 Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, et al (2015) CheckM: Assessing the quality of microbial genomes
337 recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25:1043–1055.
338 <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- 339 Ramírez-Bahena MH, Peix A, Rivas R, et al (2009) *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium*
340 *jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1929–
341 1934. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006320-0>
- 342 Remigi P, Zhu J, Young JPW, Masson-Boivin C (2016) Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing
343 Legume Symbionts. *Trends Microbiol* 24:63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>
- 344
- 345 Ribeiro P.R.A., dos Santos JV, Martins da Costa E, et al (2015) Symbiotic efficiency and genetic diversity of
346 soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agric Ecosyst Environ* 212:85–93.
347 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.017>
- 348 Rodrigues T.L. da Costa E.M. Ribeiro P.R.A., Carvalho F., Rufini M., Silva A.O., Teixeira A.F.S., Pereira T.A.,
349 Sales F.R., Moreira F.M. 2021 Diversity and biotechnological potential of rhizobia isolated from lima bean
350 nodules collected at a semiarid region. *Soil Sci Soc Am J*, 85:1663-1678. <https://doi.org/10.1002/saj2.20272>
351
- 352 Rufini M, de Pádua Oliveira D, Trochmann A, et al (2014) Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-
353 anão em casa de vegetação e no campo. *Pesqui Agropecu Bras* 49:197–206. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000300006>
354
- 355 Sá O.A.A.L., Ribeiro P.R.A., Rufini M., Cruvinel I.A.F., Casagrande D.R. Moreira F.M.S. 2019 Microsymbionts
356 of forage peanut under different soil and climate conditions belong to a specific group of *Bradyrhizobium*
357 strains. *Appl Soil Ecol*, 143:201-212 <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.07.018>
358
- 359 Saitou N., Nei M. 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol*
360 *Biol Evol* 4:406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
361
- 362 Shamseldin A (2013) The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation-review The Role of
363 Different Genes Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation-Review. *Global Journal of Biotechnology &*
364 *Biochemistry* 8:84–94. <https://doi.org/10.5829/idosi.gjbb.2013.8.4.82103>
- 365
- 366 Steenkamp ET, Stepkowski T, Przymusiak A, et al (2008) Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated
367 by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade
368 common in Africa. *Mol Phylogenet Evol* 48:1131–1144. <https://doi.org/10.1016/j.ymp.2008.04.032>
- 369 Tamura K. 1992 Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-
370 Transversion and G+C-Content Biases ' *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687.
371 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>

- 372 Xu L.M., Cui GE, Fan J.Li.H. 1995 *Bradyrhizobium liaonigense* sp. nov. isolated from the root nodules of
373 soybeans. Int J Syst Bacteriol v. 45:706-711. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-706>
374
- 375 Wang JY, Wang R, Zhang YM, et al (2013) *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules.
376 Int J Syst Evol Microbiol 63:616–624. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.034280-0>
- 377
- 378 Yu X, Cloutier S, Tambong JT, Bromfield ESP (2014) *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., A symbiotic nitrogen
379 fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. Int J Syst Evol Microbiol 64:3202–3207.
380 <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065540-0>
- 381 Zhang YM, Li Y, Chen WF, et al (2012) *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic
382 bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. Int J Syst Evol Microbiol 62:1951–1957.
383 <https://doi.org/10.1099/ijs.0.034546-0>
- 384
- 385
- 386
- 387
- 388
- 389
- 390
- 391
- 392
- 393
- 394
- 395
- 396
- 397
- 398
- 399
- 400
- 401
- 402
- 403
- 404
- 405
- 406
- 407
- 408
- 409
- 410
- 411
- 412
- 413
- 414
- 415
- 416
- 417
- 418
- 419
- 420
- 421
- 422

423 **Legenda das figuras**

424

425 **Fig. 1** Filogenia do gene *nifA* (898 pb) utilizando o método *maximum likelihood* mostrando a relação entre as
426 estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (50). Valores de *bootstrap*
427 superiores a 50% são indicados nos nós. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de
428 *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes do amendoim estão na cor azul, as estirpes
429 de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa estirpe eficiente em fixar
430 biologicamente o N₂ e a sigla {EFI-} estirpes pouco eficientes.

431

432 **Figura 2.** Filogenia do gene *nifB* (626 pb), utilizando o método *maximum likelihood* mostrando a relação entre as
433 estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (53). Valores de *bootstrap*
434 superiores a 50% são indicados nos nós. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de
435 *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes
436 de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa estirpe eficiente em fixar
437 biologicamente o N₂ e a sigla {EFI-} estirpes pouco eficientes

438

439 **Fig. 3** Filogenia do gene *nifD* (1206 pb) usando o método *maximum likelihood* mostrando a relação entre as
440 estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies do gênero *Bradyrhizobium* já descritas (54). Valores de *bootstrap*
441 superiores a 50% são indicados nos nós. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de
442 *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes
443 de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa estirpe eficiente em fixar
444 biologicamente o N₂ e a sigla {EFI-} estirpes pouco eficientes.

445

446 **Fig. 4** Filogenia do gene *fixJ* (1352 pb) baseada no método *maximum likelihood* mostrando a relação entre as
447 estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (49). Valores de *bootstrap*
448 superiores a 50% são indicados nos nós. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de
449 *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes
450 de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-
451 } as estirpes pouco eficientes.

452

453 **Fig. 5** Filogenia do gene *fixL* (1105 pb) utilizando o método *maximum likelihood* mostrando a relação entre as
454 estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (49). Valores de *bootstrap*
455 superiores a 50% são indicados nos nós. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de
456 *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes
457 de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-
458 } as estirpes pouco eficientes.

459

Tabela 1. Código das estirpes, espécie vegetal e local (estado brasileiro) de onde as estirpes foram isoladas, referências dos organismos em estudo e as coordenadas geográficas de cada estirpe

Código das estirpes	Planta hospedeira – experimento de eficiência	Isolamento original das estirpes	Referências	Coordenadas geográficas
UFLA05-112 {EFI+} *	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al, (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-111 {EFI+}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-98 {EFI+}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-153 {EFI+}	<i>Arachis pintoi</i>	Minas Gerais	SÁ et al., (2019)	21° 14' S; 44° 58' O
UFLA05-158 {EFI+}	<i>Arachis pintoi</i>	Minas Gerais	SÁ et al., (2019)	21° 14' S; 44° 58' O
UFLA05-126 {EFI+}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-150 {EFI+}	<i>Arachis pintoi</i>	Minas Gerais	SÁ et al. (2019)	21° 14' S; 44° 58' O
UFLA05-96 {EFI+}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-109 {EFI-}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-129 {EFI-}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-108 {EFI-}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-89 {EFI-}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S; 39° 30' O
UFLA05-125 {EFI-}	<i>Arachis pintoi</i>	Bahia	SÁ et al., (2019)	16° 48' S e 39° 30' O
UFLA06-24 {EFI+}	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al., (2015)	9_190210'S; 44_480550' O
UFLA06-12 {EFI+}	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al., (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-28 {EFI+}	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al., (2015)	9_190210'S; 44_480550' O
UFLA06-29 {EFI+}	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al., (2015)	9_190210'S; 44_480550' O
UFLA06-07 {EFI+}	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al., (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-03 {EFI+}	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al., (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-42 {EFI+}	<i>Glycine max</i> L.	Santa Catarina	RIBEIRO et al., (2015)	27_29013''S; 51_24058'' O
UFLA06-11 {EFI-}	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al., (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-06 {EFI-}	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al., (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-40 {EFI-}	<i>Glycine max</i> L.	Mato Grosso do Sul	RIBEIRO et al., (2015)	22_13056''S; 54_59025'' O
UFLA06-05 {EFI-}	<i>Glycine max</i> L.	Minas Gerais	RIBEIRO et al., (2015)	21_120170'S; 44_580490' O
UFLA06-37 {EFI-}	<i>Glycine max</i> L.	Mato Grosso do Sul	RIBEIRO et al., (2015)	22_13056''S; 54_59025'' O
UFLA06-26 {EFI-}	<i>Glycine max</i> L.	Piauí	RIBEIRO et al., (2015)	9_190210'S, 44_480550' O
UFLA02-195 {EFI+}	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18'' S; 44°945.10'' O
UFLA02-199 {EFI+}	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18'' S; 44°945.10'' O
UFLA02-206 {EFI+}	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18'' S; 44°945.10'' O

UFLA02-221 {EFI+}	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
UFLA 03-144 {EFI+}	<i>Vigna unguiculata L.</i>	Amazônia	GUIMARÃES et al., (2012)	4°21 a 4°26 S; 69°36 a 70°1 O
INPA86A {EFI+}	<i>Swartzia sp.</i>	Amazônia	MOREIRA et al., (1993)	-
UFLA02-242 {EFI+}	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
UFLA02-208 {EFI-}	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
UFLA02-213 {EFI-}	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
UFLA02-259 {EFI-}	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Piauí	RODRIGUES et al., (2021)	8°55'9.18" S; 44°945.10" O
INPA237B {EFI-}	<i>Pterocarpus sp.</i>	Amazônia	GUIMARÃES et al., (2015)	-
UFLA03-320 {EFI-}	<i>Vigna unguiculata</i>	Minas Gerais	RUFINI et al., (2014)	21°20'S; 45°00' O

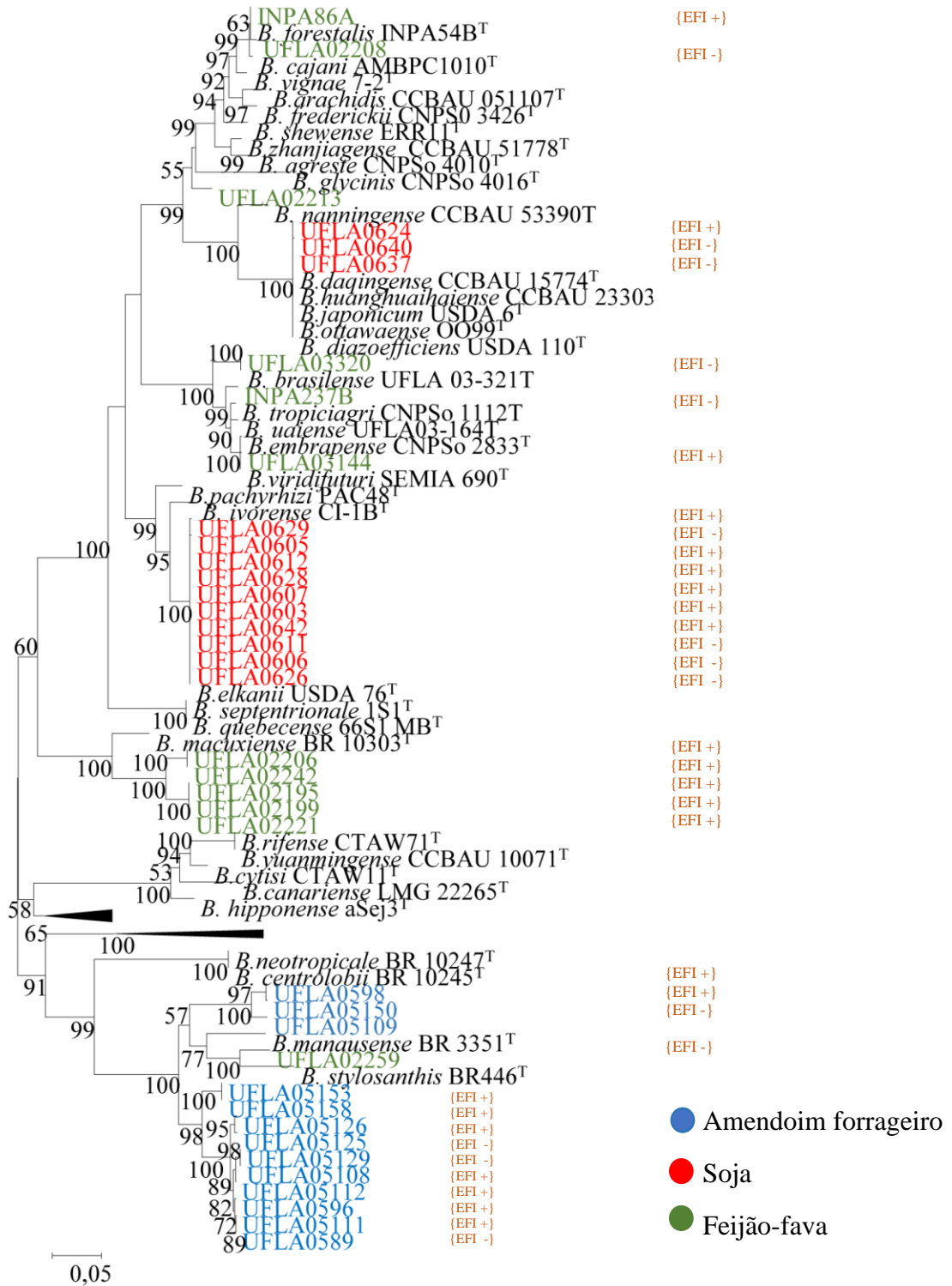
* A sigla {EFI+} representa estirpe eficiente em fixar biologicamente o N₂ e a sigla {EFI-} estirpes pouco eficientes.

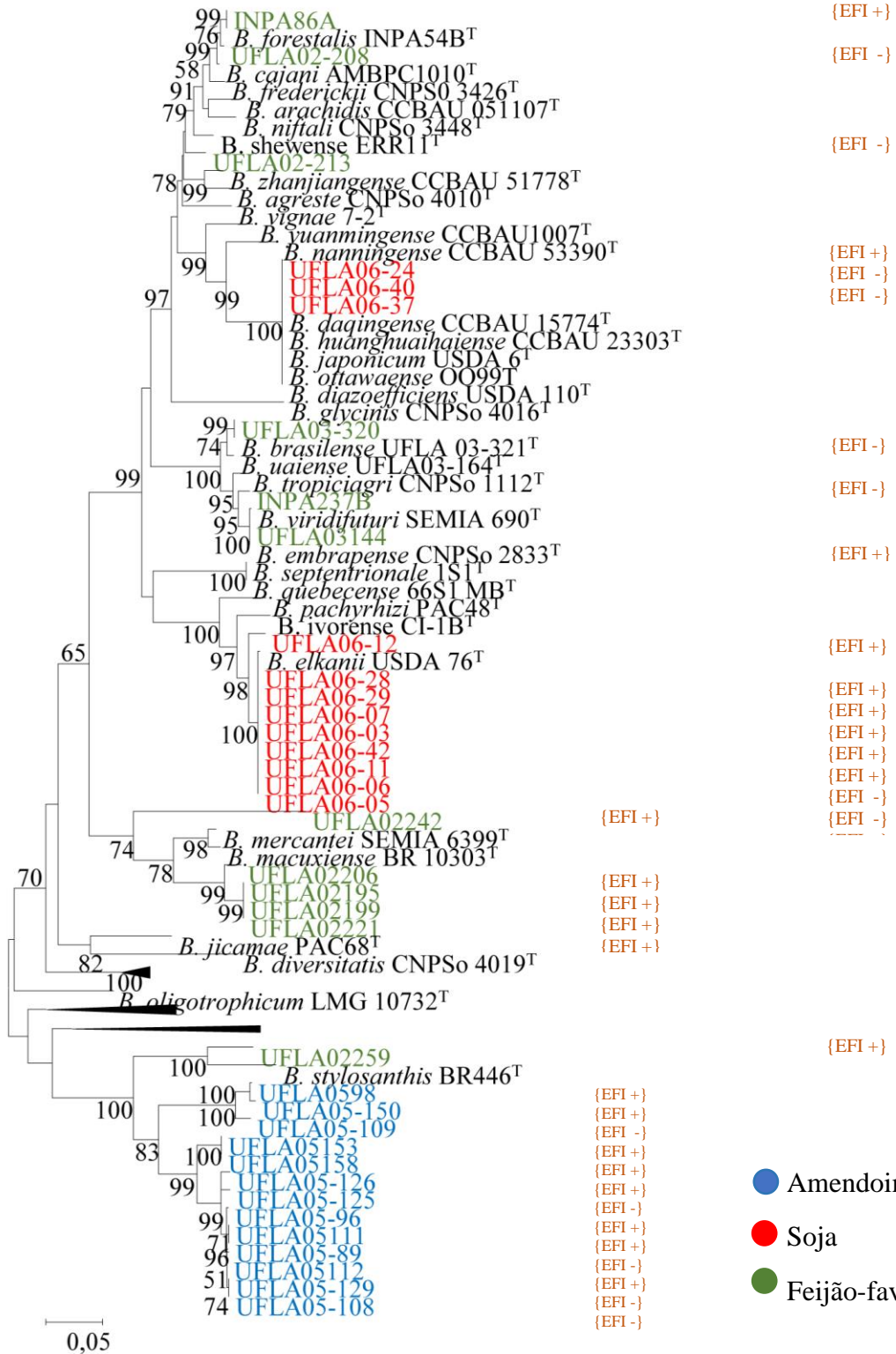
Tabela 2. Genes *nif* e *fix* encontrados nas 38 estirpes simbiotes de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava

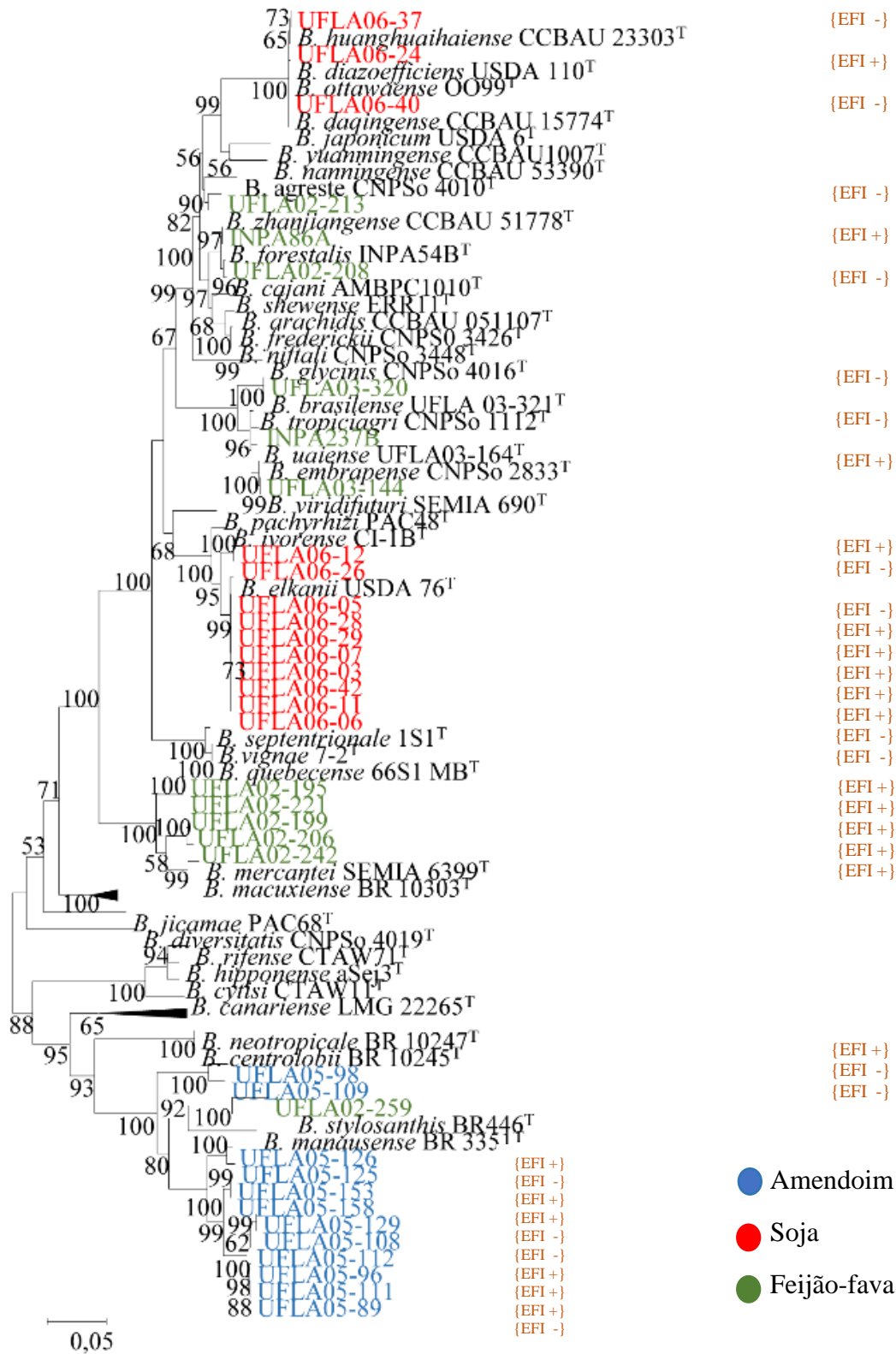
	<i>nifA</i>	<i>nifB</i>	<i>nifD</i>	<i>nifE</i>	<i>nifH</i>	<i>nifK</i>	<i>nifN</i>	<i>nifX</i>	<i>nifZ</i>	<i>nifQ</i>	<i>nifW</i>	<i>nifF</i>	<i>nifL</i>	<i>nifT</i>	<i>fixJ</i>	<i>fixL</i>
UFLA05-112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UFLA05-111	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UFLA05-98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UFLA05-153	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA05-158	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA05-126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA05-150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UFLA05-96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA05-109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UFLA05-129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA05-108	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA05-89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UFLA05-125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
					+											
UFLA06-24	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA06-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA02-195	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+

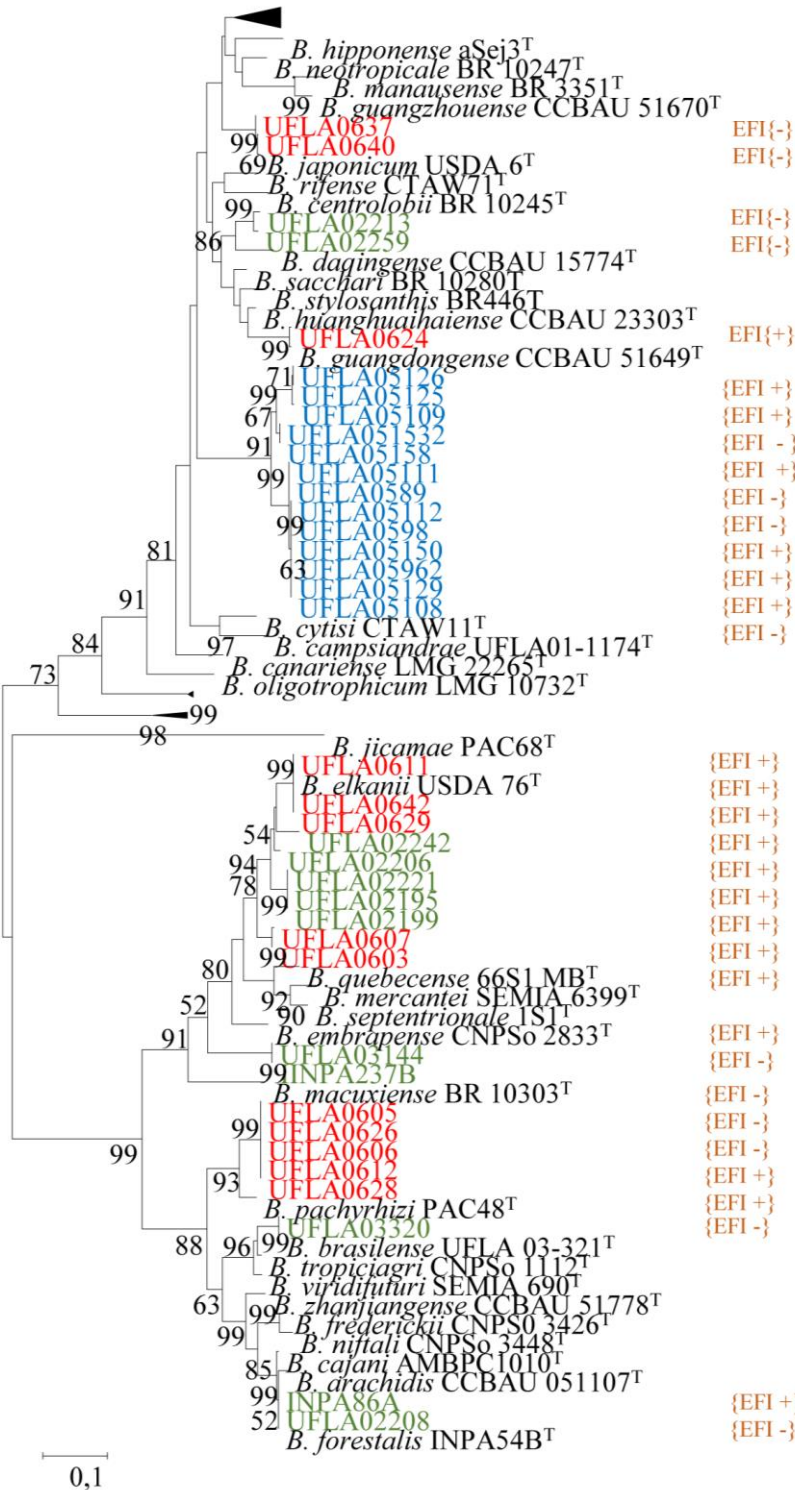
UFLA02-199	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA02-206	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA02-221	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA03-144	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
INPA86A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA02-242	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA02-208	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA02-213	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA02-259	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
INPA237B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFLA03-320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+

* O sinal positivo representa a presença dos genes nas estirpes estudadas. O sinal negativo a ausência do gene. As estirpes em negrito foram eficientes na FBN. As demais estirpes foram pouco eficientes.









- Amendoim forrageiro
- Soja
- Feijão-fava

Supplementary material

Filogenia de genes relacionadas a fixação biológica de nitrogênio em 38 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de *Glycine max* L., *Arachis pintoi* e *Phaseolus lunatus* L.

Daniele Cabral Michel, Teotonio Soares de Carvalho, Konstantinos T. Konstantinidis, Fatima Maria de Souza Moreira*

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail address: fmoreira@ufla.br (F.M. de Souza Moreira)

Tabela S1. Número de acesso dos genomas das estirpes tipo das espécies *Bradyrhizobium* de onde foram retirados os genes *nif*

Estirpes	<i>nifA</i>	<i>nifB</i>	<i>nifD</i>	<i>nifE</i>	<i>nifH</i>	<i>nifK</i>	<i>nifN</i>
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	NZ_LGTB000000 00.1	NZ_LGTB000000 0.1	NZ_LGTB000000 0.1	NZ_LGTB000000 0.1	KR149137	NZ_LGTB000000 00.1	NZ_LGTB000000 0.1
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	KC509196.1	NZ_CP030050.1	NZ_CP030050.1	NZ_CP030050.1	KF962705	NZ_CP030050.1	NZ_CP030050.1
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	MN905127.1	VSST00000000.1	VSST00000000.1	VSST00000000.1	AJ560653	VSST00000000.1	VSST00000000.1
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	LM994609.1	NZ_VSSR0000000 0.1	NZ_VSSR0000000 0.1	NZ_VSSR0000000 0.1	EU597844	NZ_CP030050.1	NZ_VSSR0000000 0.1
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	KC509194.1	NZ_VLKL000000 00.1	NZ_VLKL000000 00.1	NZ_VLKL000000 00.1	HQ231326	NZ_VLKL000000 00.1	NZ_VLKL000000 00.1
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	ARAG00000000.1	ARAG00000000.1	ARAG00000000.1	ARAG00000000.1	AB354631	ARAG00000000.1	ARAG00000000.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	NZ_VLLA000000 00.1	NZ_VLLA000000 0.1	NZ_VLLA000000 0.1	NZ_VLLA000000 0.1	KF472814	NZ_VLLA000000 00.1	NZ_VLLA000000 0.1
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	NZ_CP016428.1	NZ_CP016428.1	NZ_CP016428.1	NZ_CP016428.1	KF896159	NZ_CP016428.1	NZ_CP016428.1
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	-	-	-	-	KF927054	-	-
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	-	-	-	-	AB301000	-	-
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	NC_017249.1	NC_017249.1	NC_017249.1	NC_017249.1	AP012206	NC_017249.1	NC_017249.1
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	LLXZ00000000.1	LLXZ00000000.1	LLXZ00000000.1	LLXZ00000000.1	AB573869	LLXZ00000000.1	LLXZ00000000.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	LLYB00000000.1	LLYB00000000.1	LLYB00000000.1	LLYB00000000.1	GU433565	LLYB00000000.1	LLYB00000000.1
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	-	-	-	-	GU263466	-	-
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	LJYG00000000.1	-	LJYG00000000.1	LJYG00000000.1	KF786002.1	LJYG00000000.1	LJYG00000000.1
<i>B. neotropicae</i> BR 10247 ^T	LSEF00000000.1	LSEF00000000.1	LSEF00000000.1	LSEF00000000.1	KJ661727	LSEF00000000.1	LSEF00000000.1
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	NC_020453.1	NC_020453.1	NC_020453.1	NC_020453.1	NC_020453.1	NC_020453.1	NC_020453.1
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	NZ_CP029425.1	NZ_CP029425.1	NZ_CP029425.1	NZ_CP029425.1	HQ587980	NZ_CP029425.1	NZ_CP029425.1
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	LFIQ00000000.1	LFIQ00000000.1	LFIQ00000000.1	LFIQ00000000.1	AB573868	LFIQ00000000.1	LFIQ00000000.1
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	NZ_CP042968.1	NZ_CP042968.1	NZ_CP042968.1	NZ_CP042968.1	KF896160	NZ_CP042968.1	NZ_CP042968.1
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	LLYA00000000.1	LLYA00000000.1	LLYA00000000.1	LLYA00000000.1	KC247112	LLYA00000000.1	LLYA00000000.1
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	VSSS00000000.1	VSSS00000000.1	VSSS00000000.1	VSSS00000000.1	EU597853	VSSS00000000.1	VSSS00000000.1
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1	AB354633.1	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2	KP234521	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	NZ_CP030051.1	NZ_CP030051.1	NZ_CP030051.1	NZ_CP030051.1	KC509130	NZ_CP030051.1	NZ_CP030051.1

<i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T	NZ_CP030053.1	NZ_CP030053.1	NZ_CP030053.1	NZ_CP030053.1	NZ_CP030053.1	NZ_CP030053.1	NZ_CP030053.1
<i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1
<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T	-	-	-	-	-	-	NZ_CP029427.1
<i>B. amphicarpa</i> 39S1 MB ^T	NZ_CP029426.1	NZ_CP029426.1	NZ_CP029426.1	NZ_CP029426.1	NZ_CP029426.1	NZ_CP029426.1	NZ_CP029426.1
<i>B. uaiense</i> UFLA03-164 ^T	NZ_VKHP00000000	NZ_VKHP00000000.	NZ_VKHP00000000.	NZ_VKHP00000000.	KT825888	NZ_VKHP00000000	-
<i>B. ivorensis</i> CI-1B ^T	CAADFC0000000	CAADFC0000000	CAADFC0000000	CAADFC0000000	KX396556.1	CAADFC0000000	CAADFC00000000
	00.2	00.2	00.2	00.2		00.2	0.2
<i>B. niftali</i> CNPSo 3448 ^T	-	NZ_SPQT0000000	NZ_SPQT0000000	NZ_SPQT0000000	MK675803.1	NZ_SPQT0000000	NZ_SPQT0000000
		0.1	0.1	0.1		0.1	0.1
<i>B. campsiandrae</i> UFLA01-1174 ^T	-	JAANIH00000000	JAANIH00000000	JAANIH00000000	JAANIH00000000	-	JAANIH000000000
		0.1	0.1	0.1	0.1		.1
<i>B. archetypum</i> WSM 1744 ^T	JAAVLW0000000	JAAVLW0000000	JAAVLW0000000	JAAVLW0000000	MK893251	JAAVLW0000000	JAAVLW00000000
	00	00	00	00		00	0
<i>B. australiense</i> WSM 1791 ^T	JAAVLX00000000	JAAVLX00000000	JAAVLX00000000	JAAVLX00000000	MK893253	JAAVLX00000000	JAAVLX00000000
	0	0	0	0		0	0
<i>B. murdochi</i> WSM 1741 ^T	AXAU00000000	AXAU00000000	AXAU00000000	AXAU00000000	MK893248	AXAU00000000	AXAU00000000
<i>B. agreste</i> CNPSo 4010 ^T	NZ_JACCHP	NZ_JACCHP	NZ_JACCHP	NZ_JACCHP	MK893236.1	NZ_JACCHP	NZ_JACCHP
	P000000000.1	P000000000.1	P000000000.1	P000000000.1		P000000000.1	P000000000.1
<i>B. glycinis</i> CNPSo 4016 ^T	JACCHQ	JACCHQ	JACCHQ	JACCHQ	MK893235.1	JACCHQ	JACCHQ
	000000000.1	000000000.1	000000000.1	000000000.1		000000000.1	000000000.1
<i>B. diversitatis</i> CNPSo 4019 ^T	NZ_JACEGD	NZ_JACEGD	NZ_JACEGD	NZ_JACEGD	MK893234.1	NZ_JACEGD	NZ_JACEGD
	000000000.1	000000000.1	000000000.1	000000000.1		000000000.1	000000000.1
<i>B. hipponense</i> aSej3 ^T	NZ_VSTH000000	NZ_VSTH0000000	NZ_VSTH0000000	NZ_VSTH0000000	NZ_VSTH000000	NZ_VSTH000000	NZ_VSTH0000000
	00.1	0.1	0.1	0.1	00.1	00.1	0.1
<i>B. septentrionale</i> 1S1 ^T	JAAOLE00000000	JAAOLE00000000	JAAOLE00000000	JAAOLE00000000	KF615620.1	JAAOLE00000000	JAAOLE00000000
	0	0	0	0		0	0
<i>B. quebecense</i> 66S1 ^T	JABWSX0000000	JABWSX00000000	JABWSX00000000	JABWSX00000000	KF615665.1	JABWSX0000000	JABWSX00000000
	00	0	0	0		00	0

Tabela S2. Número de acesso dos genomas das estirpes tipo das espécies *Bradyrhizobium* descritas de onde foram retirados os genes *fix*

Estirpes	<i>fixJ</i>	<i>fixL</i>
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	NZ_LGTB00000000.1	NZ_LGTB00000000.1
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	NZ_CP030050.1	NZ_CP030050.1
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	VSST00000000.1	VSST00000000.1
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	NZ_VSSR00000000.1	NZ_VSSR00000000.1
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	NZ_VLKL00000000.1	NZ_VLKL00000000.1
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	ARAG00000000.1	ARAG00000000.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	NZ_VLLA00000000.1	NZ_VLLA00000000.1
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	NZ_CP016428.1	NZ_CP016428.1
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	-	-
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	LLXZ00000000.1	LLXZ00000000.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	LLYB00000000.1	LLYB00000000.1
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	-	-
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T	-	-
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T	NC_020453.1	NC_020453.1
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	NZ_CP029425.1	-
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	LFIQ00000000.1	LFIQ00000000.1
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	NZ_CP042968.1	-
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	LLYA00000000.1	LLYA00000000.1
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	VSSS00000000.1	VSSS00000000.1
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	FMAE00000000.1	FMAE00000000.1
<i>B. embrapense</i> CNPSO 2833 ^T	LFIP00000000.2	LFIP00000000.2
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	NZ_CP030051.1	NZ_CP030051.1
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	ASM411491v1	ASM411491v1
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	LLXX00000000.1	LLXX00000000.1
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	NZ_RDQF00000000.1	NZ_RDQF00000000.1
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463	NC_004463
<i>B. tropiciagri</i> CNPSO 1112 ^T	LFLZ00000000.1	LFLZ00000000.1
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	NZ_MKFI00000000.1	NZ_MKFI00000000.1
<i>B. forestalis</i> INPA 54B ^T	PGVG00000000	PGVG00000000
<i>B. cajani</i> AMBPC 1010 ^T	WQNE00000000.1	WQNE00000000.1
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	LVEM00000000.1	LVEM00000000.1
<i>B. shewense</i> ERR11 ^T	NZ_FMAI00000000.1	NZ_FMAI00000000.1
<i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T	NZ_LWIG00000000.1	NZ_LWIG00000000.1
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T	NZ_LUUB00000000.1	NZ_LUUB00000000.1
<i>B. brasiliense</i> UFLA 03-321 ^T	MPVQ00000000	MPVQ00000000
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T	NZ_LNCU00000000.1	NZ_LNCU00000000.1
<i>B. frederickii</i> CNPSO 3426 ^T	SPQS00000000	SPQS00000000
<i>B. nanningense</i> CCBAU 53390 ^T	LBJC00000000	-
<i>B. guangzhouense</i> CCBAU 51670 ^T	NZ_CP030053.1	NZ_CP030053.1
<i>B. zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	NZ_CP022221.1	NZ_CP022221.1
<i>B. symbiodeficiens</i> 85S1MB ^T	NZ_CP029427.1	NZ_CP029427.1
<i>B. amphicarpae</i> 39S1 MB ^T	NZ_CP029426.1	NZ_CP029426.1
<i>B. uaiense</i> UFLA03-164 ^T	NZ_VKHP00000000.1	-
<i>B. ivorense</i> CI-1B ^T	CAADFC00000000.2	-
<i>B. niftali</i> CNPSO 3448 ^T	NZ_SPQT00000000.1	NZ_SPQT00000000.1
<i>B. campsiantrae</i> UFLA01-1174 ^T	JAANIH00000000.1	JAANIH00000000.1
<i>B. archetypum</i> WSM 1744 ^T	JAAVLW00000000	JAAVLW00000000
<i>B. australiense</i> WSM 1791 ^T	JAAVLX00000000	JAAVLX00000000
<i>B. murdochi</i> WSM 1741 ^T	AXAU00000000	AXAU00000000
<i>B. agreste</i> CNPSO 4010 ^T	JADCPZ00000000	JADCPZ00000000
<i>B. glycinis</i> CNPSO 4016 ^T	JADFUD00000000	JADFUD00000000
<i>B. diversitatis</i> CNPSO 4019 ^T	NZ_JACCHP00000000.1	NZ_JACCHP00000000.1
<i>B. hipponense</i> aSej3 ^T	JACCHQ00000000.1	JACCHQ00000000.1
<i>B. septentrionale</i> 1S1 ^T	NZ_JACEGD00000000.1	NZ_JACEGD00000000.1
<i>B. quebecense</i> 66S1 ^T	NZ_VSTH00000000.1	NZ_VSTH00000000.1

Tabela S3. Genes *nif* e *fix* e o papel deles na FBN.

<i>nifH</i>	Gene estrutural da nitrogenase ¹
<i>nifD</i>	Gene estrutural da nitrogenase ¹
<i>nifK</i>	Gene estrutural da nitrogenase ¹
<i>nifE</i>	Biossíntese de FeMo-co ¹
<i>nifN</i>	Biossíntese de FeMo-co ¹
<i>nifB</i>	Biossíntese de FeMo-co ¹
<i>nifX</i>	Biossíntese de FeMo-co ¹
<i>nifW</i>	Função desconhecida ¹
<i>nifZ</i>	Maturação da nitrogenase ¹
<i>nifA</i>	Função regulatória – elemento de regulação positiva ²
<i>nifQ</i>	Biossíntese de FeMo-co ¹
<i>nifF</i>	Doação de elétrons ¹
<i>nifL</i>	Função regulatória – elemento de regulação negativa ²
<i>nifT</i>	Função desconhecida ²
<i>fixJ</i>	Regulador transcricional ³
<i>fixL</i>	Regulador transcricional ³

Masson-Boivin et al. 2009¹; Klip et al. 2004²; Laranjo et al. 2014³

Fig S1. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *nifE* (1375 pb) apresentando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (54). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo usado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-} as estirpes pouco eficientes.

Fig. S2 Filogenia baseada na sequência do gene *nifH* (171 pb) apresentando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (63). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo utilizado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-} as estirpes pouco eficientes.

Fig S3. Árvore filogenética do gene *nifK* (1541 pb) apresentando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (54). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo usado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso das sequências genômicas das espécies de *Bradyrhizobium* estão descritos na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-} as estirpes pouco eficientes.

Fig S4. Filogenia do gene *nifN* (880 pb) mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (54). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo utilizado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso dos genomas das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* é dado na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-} as estirpes pouco eficientes.

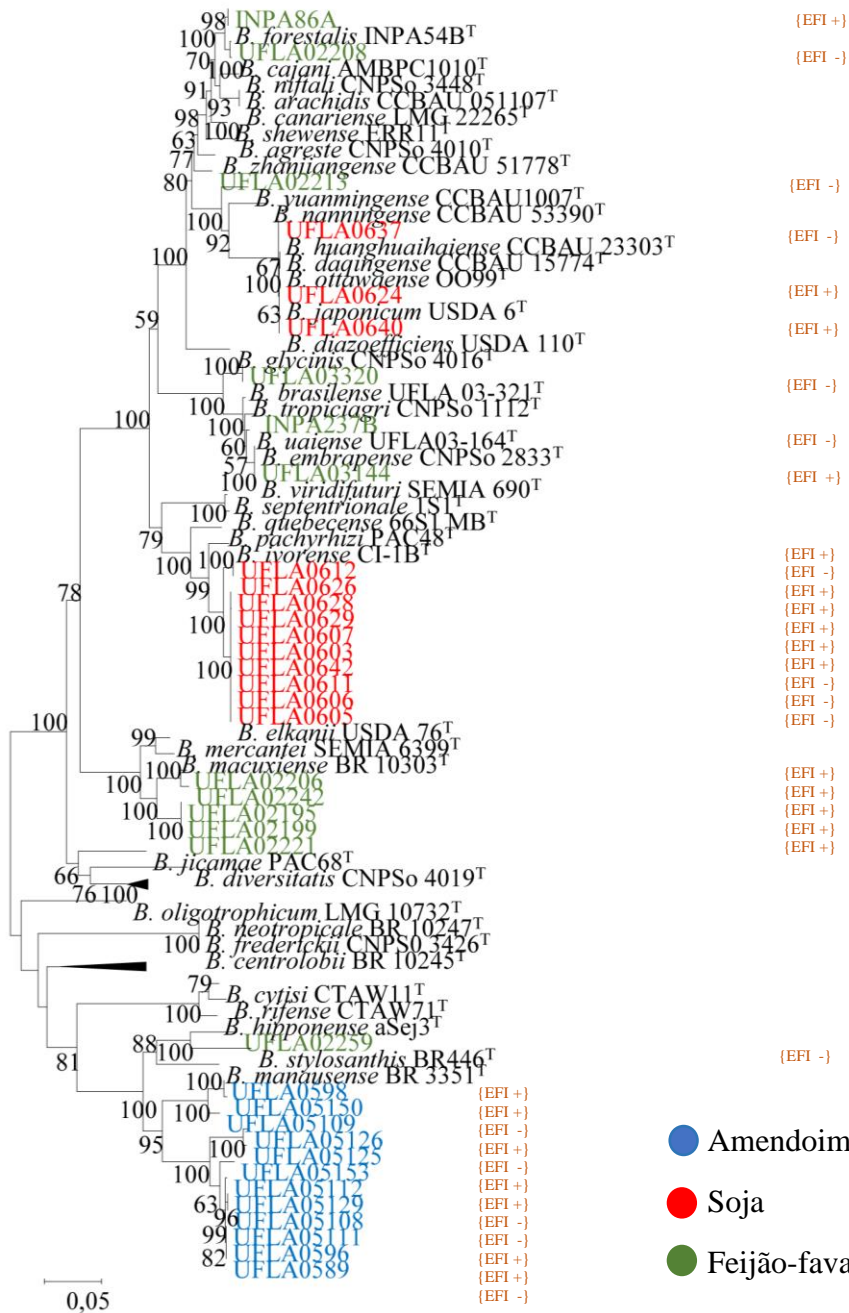
Fig S5. Filogenia do gene *nifQ* (328 pb) mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (54). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo utilizado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso dos genomas das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* é dado na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-} as estirpes pouco eficientes.

Fig S6. Filogenia do gene *nifX* (392 pb) mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (56). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo utilizado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso dos genomas das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* é dado na tabela S1. As estirpes simbiotes de amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-} as estirpes pouco eficientes.

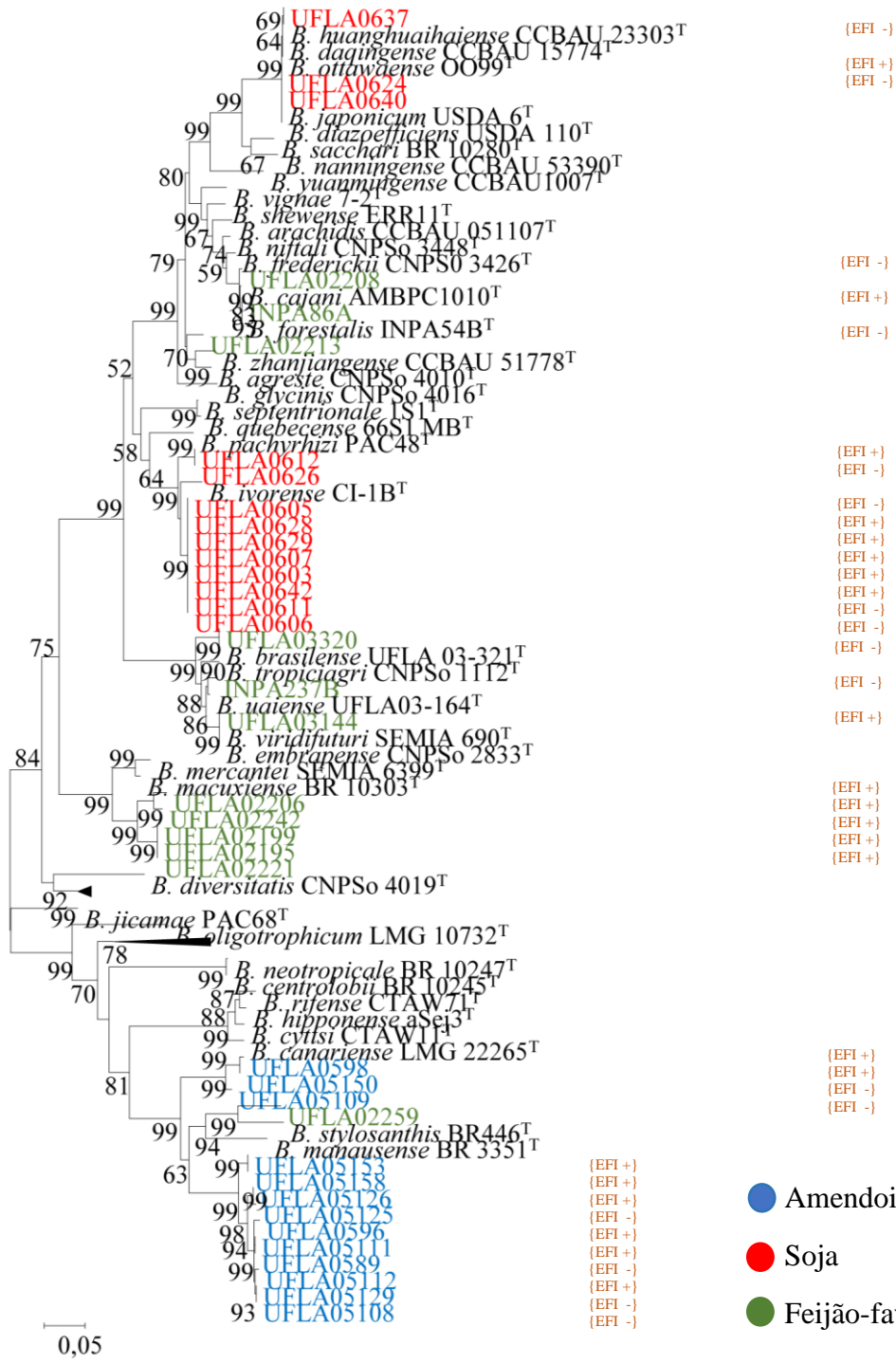
Fig S7. Filogenia do gene *nifZ* (288 pb) mostrando a relação entre as estirpes em estudo e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* já descritas (55). Valores de *bootstrap* maiores que 50% estão indicados nos nós. O modelo estatístico utilizado foi o *maximum-likelihood*. O número de acesso dos genomas das estirpes tipo do gênero *Bradyrhizobium* é dado na tabela S1. As estirpes testadas em amendoim estão na cor azul, as estirpes de soja em vermelho e as estirpes de feijão-fava em verde. A sigla {EFI+} representa as estirpes eficientes e {EFI-} as estirpes pouco eficientes.



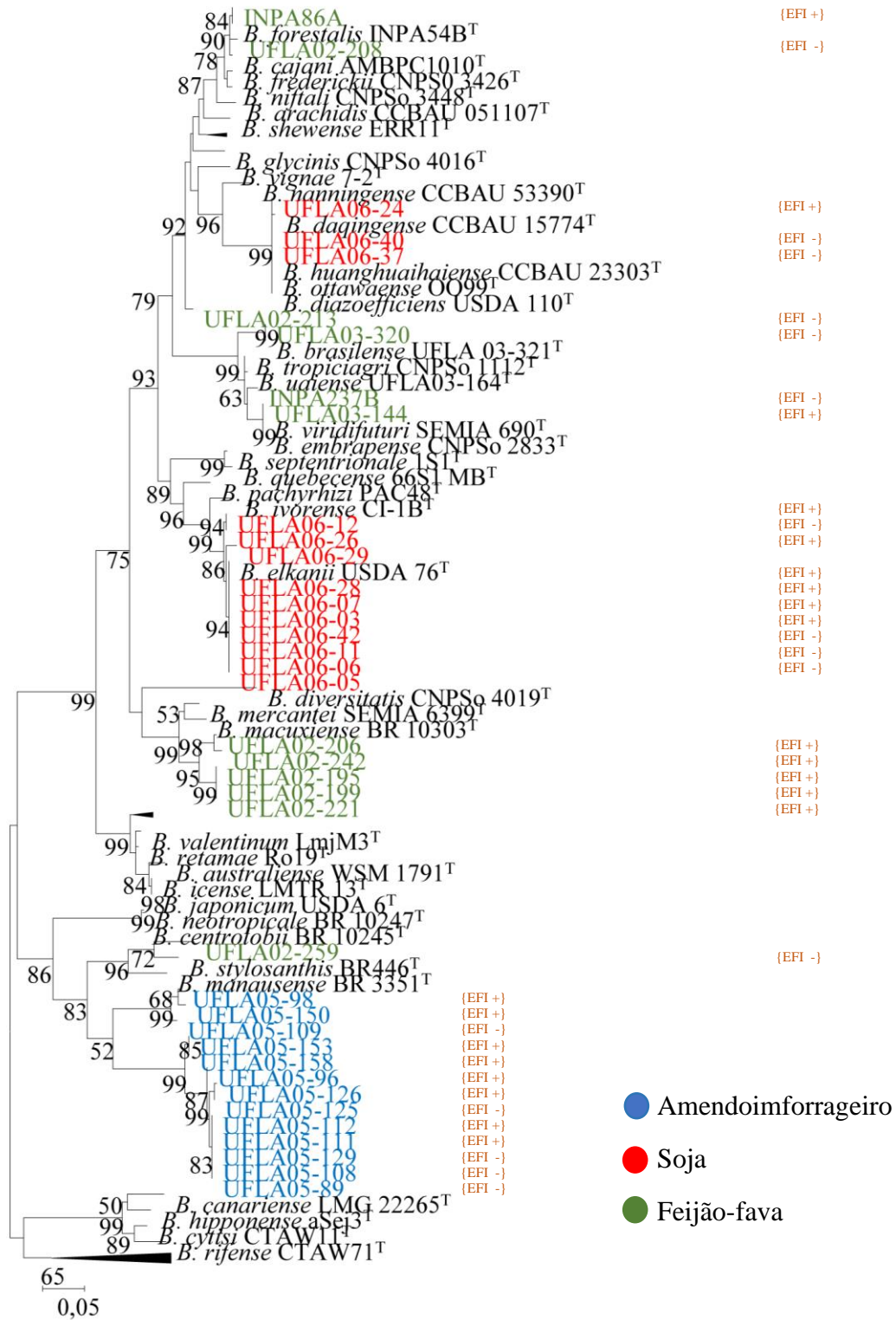
- Amendoim forrageiro
- Soja
- Feijão-fava



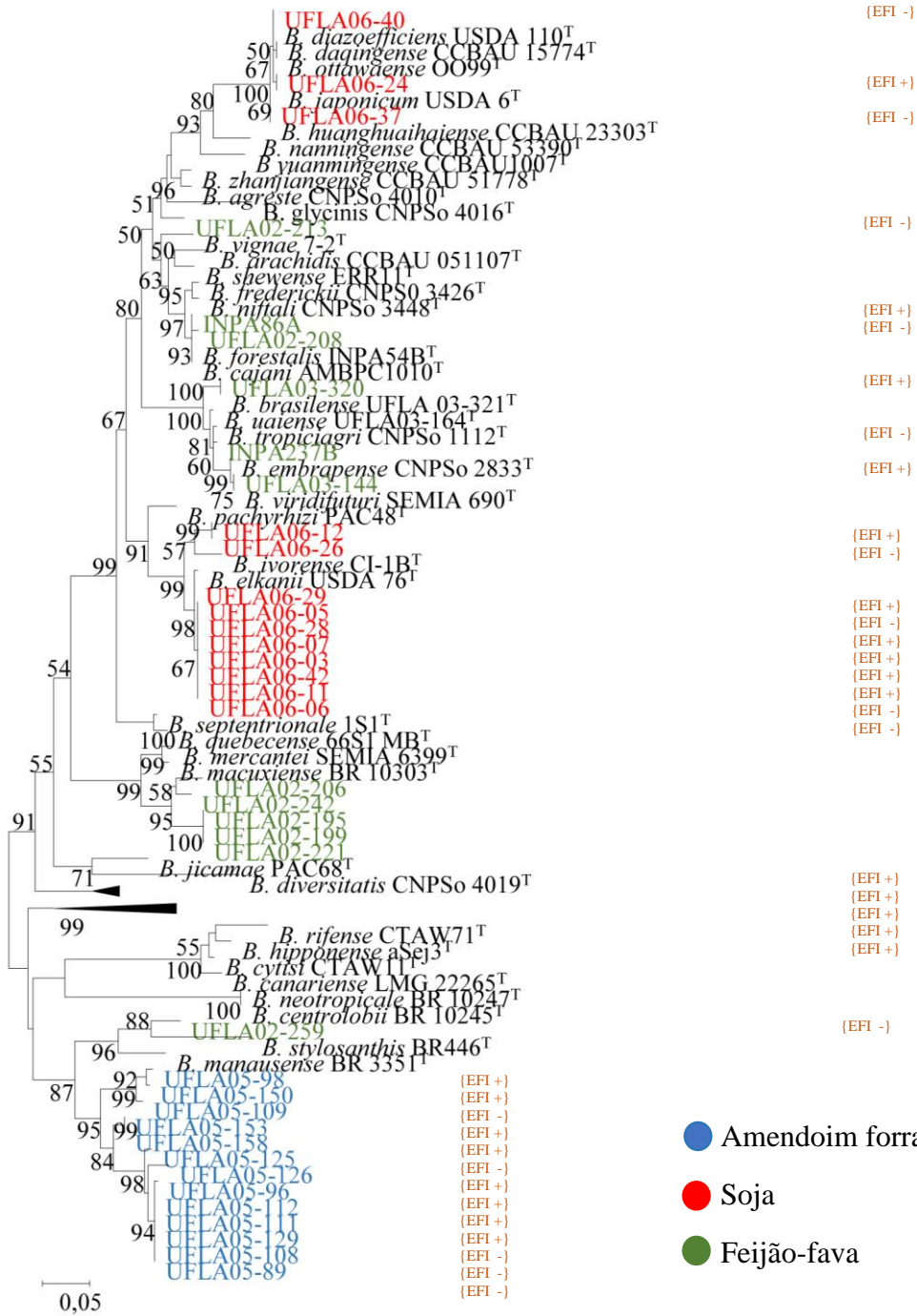
- Amendoim forrageiro
- Soja
- Feijão-fava



- Amendoim forrageiro
- Soja
- Feijão-fava







- Amendoim forrageiro
- Soja
- Feijão-fava

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo que como amplamente discutido na tese, é de extrema importância para a natureza. Esse processo também é realizado por microrganismos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e como ressaltado, são extremamente importantes na agricultura brasileira e internacional no cultivo de algumas leguminosas, como a soja, por exemplo. Esses microrganismos são bastante versáteis e se distribuem em diferentes localidades do mundo e além disso, são capazes de estabelecer simbioses com diferentes plantas hospedeiras.

Considerando todos os benefícios que o gênero *Bradyrhizobium* traz consigo, identificá-los e descrevê-los a nível de espécie, comparar seus genomas sequenciados e partir disso verificar a presença ou ausência de genes simbióticos relacionados a FBN é de extrema importância. Além disso, relacionar o posicionamento filogenético dos genes simbióticos de estirpes isoladas de *Bradyrhizobium* pode mostrar relações entre estes e a origem geográfica e/ou a planta hospedeira delas. Para a execução e obtenção dos objetivos, utilizou-se diferentes metodologias como análises dos genes 16S rRNA, “genes housekeeping”, genes simbióticos para a descrição de espécies. Sendo os isolados provenientes de Minas Gerais e Amazônia. Também foram utilizadas técnicas de comparação genômica como o ANI e o MAUVE, sequenciamento, montagem e anotação genômica, inclusive a análise filogenética dos genes simbióticos (*nod*, *nif*, *fix*) para 38 genomas de estirpes simbiotes de três diferentes leguminosas (amendoim-forrageiro, soja e feijão-fava).

A partir das análises realizadas realizadas acima, conseguiu-se atingir alguns objetivos como a descrição de espécies, identificação de novas espécies dentro do grupo dos 38 simbiotes que tiveram seus genomas sequenciados, o posicionamento dos 38 isolados comparado com as espécies de *Bradyrhizobium* já descritas, identificou-se a presença e ausência de diferentes genes relacionados ao processo de nodulação e fixação biológica de nitrogênio e por fim avaliou-se o posicionamento filogenético das 38 estirpes para os genes *nod*, *nif* e *fix* avaliados nesse estudo. Com isso, a hipótese do trabalho se confirmou pois dentro do gênero *Bradyrhizobium* observou-se alta diversidade genética entre as estirpes desse trabalho e as espécies já descritas e também há alta variação genômica entre os 38 simbiotes de amendoim forrageiro, soja e feijão-fava.

Em pesquisas futuras, novos genes podem ser pesquisados a fim de que a eficiência no processo de FBN possa ser identificado a partir da presença de determinados genes e seus posicionamentos filogenéticos. Outra possibilidade seria identificar esses genes em estirpes de *Bradyrhizobium* reconhecidamente eficientes e verificar quais destes genes estão sendo de fato expressos e por isso, sendo utilizados na fixação biológica de N₂ e tentar identifica-los em outras estirpes. Embora, cada espécie pode responder de modo diferente aos diferentes estímulos que existem no ambiente solo. No entanto, as idéias propostas são novos direcionamentos para que a pesquisa possa evoluir na identificação de determinados fatores genéticos que podem ter influência na FBN.