

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Explorando o potencial genético de rizóbios: uma abordagem sobre Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) e Elementos Mobilizáveis Integrativos (IMEs)**

Luiza Maria Oliveira de Lima  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**LUIZA MARIA OLIVEIRA DE LIMA**

**Explorando o potencial genético de rizóbios: uma abordagem sobre Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) e Elementos Mobilizáveis Integrativos (IMEs)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Mateus Ferreira Santana

Coorientadora: Marisa Vieira de Queiroz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L732e  
2025

Lima, Luiza Maria Oliveira de, 1997-

Explorando o potencial genético de rizóbios: uma abordagem sobre Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) e Elementos Mobilizáveis Integrativos (IMEs) / Luiza Maria Oliveira de Lima. – Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (64 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mateus Ferreira Santana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.462>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Rizóbio. 2. Genômica. 3. Crescimento (Plantas).  
4. Sequências repetitivas dispersas. I. Santana, Mateus Ferreira, 1983-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.334

**LUIZA MARIA OLIVEIRA DE LIMA**

**Explorando o potencial genético de rizóbios: uma abordagem sobre Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) e Elementos Mobilizáveis Integrativos (IMEs)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de maio de 2025.

Assentimento:

---

Luiza Maria Oliveira de Lima  
Autora

---

Mateus Ferreira Santana  
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 15/07/2025 às 14:33:27 e pelo orientador em 15/07/2025 às 17:23:42. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **FX2J.3DE3.VY6K** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico este trabalho a todos aqueles que cruzaram o meu caminho e que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Em especial, àqueles que permaneceram ao meu lado e enfrentaram comigo os desafios dessa jornada: ao meu parceiro Gabriel, à minha família e aos poucos — porém valiosos — amigos. Dedico também àqueles que acreditaram em mim e, com carinho especial, a mim mesma, pela perseverança em superar os obstáculos e seguir firme até o fim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, que me incentivou por toda a vida a buscar o estudo como forma de mudar de vida. À minha mãe, que abdicou de tanto para ver o sucesso de suas filhas. À minha irmã, que foi minha amiga e, por vezes, me amparou nos momentos de ansiedade. Ao meu pai, pelo suporte. Ao meu cunhado, Antônio, por alegrar os ambientes com suas piadas — nem tão engraçadas assim. À minha cachorrinha Rebecca, por ser meu suporte emocional e me fazer rir com seu jeitinho desengonçado. Aos meus tios e primos da família Oliveira, que sempre se fizeram presentes nos processos, ofereceram conselhos e auxiliaram nas dificuldades.

Agradeço ao meu companheiro, Gabriel Felix, que foi um excelente amigo e apoio nesse processo. Gabriel foi parceiro desde que entrou na minha vida — de forma afetiva, como amigo e também como companheiro de trabalho — e contribuiu muito para o êxito da minha pesquisa e para que eu chegasse até aqui.

Agradeço também aos meus amigos, principalmente àqueles que estão comigo há uma vida, mas também aos que conheci ao longo do processo e àqueles que já não fazem mais parte da minha caminhada. Agradeço-lhes por todo o amparo, pelas conversas, vivências e, principalmente, por compreenderem a minha ausência nesse período. Saber que os tenho comigo foi fundamental para tornar essa caminhada, que foi tão árdua, mais leve.

Agradeço à ciência, aos médicos da Divisão Psicossocial da UFV e a Deus, que me permitiram finalizar este trabalho, apesar de todos os percalços e dos desafios relacionados à minha saúde emocional. A trajetória não foi fácil, mas, com o suporte adequado, foi possível continuar.

Agradeço ao Grupo de Genômica Eco-Evolutiva Microbiana pelos conhecimentos compartilhados, principalmente à Sumaya e ao Osiel. Agradeço também ao Laboratório de Genética Microbiana Molecular e ao Laboratório de Associações Micorrízicas pelo apoio e suporte nas análises.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, que me acolheu desde 2017, tornando-se um lugar muito especial e do qual sempre levarei comigo um pedaço.

Agradeço ao Departamento de Microbiologia, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e à Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola por todo o suporte durante o período do mestrado.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A força não vem de vencer, mas de atravessar as dificuldades — e, como ensina Herculano, a vontade vence os obstáculos. Quando os desafios se tornam caminho, descobrimos que a maior descoberta não está no fim, mas na coragem que nos trouxe até lá.

(Alexandre Herculano, adaptado)

## RESUMO

LIMA, Luiza Maria Oliveira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2025. **Explorando o potencial genético de rizóbios: uma abordagem sobre Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) e Elementos Mobilizáveis Integrativos (IMEs)**. Orientador: Mateus Ferreira Santana. Coorientadora: Marisa Vieira de Queiroz.

A demanda por fertilizantes, representa um dos maiores desafios globais devido ao alto custo e potencial de contaminação ambiental, impactando negativamente a agricultura e colocando em risco a segurança alimentar mundial. Por outro lado, prevê-se que a produção agrícola precise aumentar 60% até 2050 para atender a crescente demanda, o que torna urgente o desenvolvimento de soluções sustentáveis. Neste contexto, a biotecnologia agrícola, com ênfase no uso de microrganismos promotores de crescimento de planta, surge como uma abordagem promissora, por serem ecologicamente sustentável com baixo impacto ambiental. Os Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) e os Elementos Mobilizáveis e Integrativos (IMEs) nos genomas de rizóbios, especialmente da família *Rhizobiaceae*, apresentam um repertório de genes acessórios com potencial para promover o crescimento vegetal, hipótese investigada por meio de análises in silico que incluíram a caracterização de ICEs e IMEs em genomas bacterianos. Os ICEs, elementos genéticos móveis capazes de realizar transferência horizontal de genes por conjugação, emergem como candidatos promissores para o desenvolvimento de bioinoculantes eficientes e bioprodutos agrícolas sustentáveis. Nossas análises in silico fornecem indícios iniciais de que esses elementos podem abrigar genes com funções relevantes, mas sua efetividade prática dependerá de validações experimentais em estudos futuros. Neste trabalho, 568 genomas completos de rizóbios foram investigados quanto à presença de ICEs e IMEs, utilizando softwares como ICEfinder, OriTfinder, CONJScan e Geneious Prime. Foram identificados 329 ICEs putativos, cuja localização cromossômica foi confirmada e cuja presença de componentes essenciais, como o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) foi analisada. Os resultados revelam uma distribuição variada dos ICEs e IMEs entre os gêneros, com destaque para *Bradyrhizobium*, onde foi identificado o maior número de ICEs (173), seguido por *Agrobacterium* (51) e *Rhizobium* (33). Os resultados indicaram que as bactérias estudadas apresentam alta ocorrência de ICEs e IMEs, com diversidade notável entre gêneros e espécies, especialmente no gênero *Bradyrhizobium* que possui uma maior diversidade de genes cargo, o que pode contribuir para sua adaptabilidade em diferentes ecossistemas.

Palavras-chave: conjugação genômica; mobiloma; promoção de crescimento vegetal

## ABSTRACT

LIMA, Luiza Maria Oliveira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2025. **Exploring the genetic potential of rhizobia: an approach to Integrative and Conjugative Elements (ICEs) and Integrative Mobilizable Elements (IMEs).** Adviser: Mateus Ferreira Santana. Co-adviser: Marisa Vieira de Queiroz.

The demand for fertilizers represents one of the greatest global challenges due to their high cost and potential for environmental contamination, negatively impacting agriculture and jeopardizing global food security. On the other hand, agricultural production is projected to increase by 60% by 2050 to meet growing demand, making the development of sustainable solutions urgent. In this context, agricultural biotechnology, with an emphasis on plant growth-promoting microorganisms, emerges as a promising approach due to its ecological sustainability and low environmental impact.

Integrative and Conjugative Elements (ICEs) and Integrative and Mobilizable Elements (IMEs) in the genomes of rhizobia, particularly those of the *Rhizobiaceae* family, harbor a repertoire of accessory genes with potential for promoting plant growth—a hypothesis investigated through in silico analyses that included the characterization of ICEs and IMEs in bacterial genomes. ICEs, mobile genetic elements capable of horizontal gene transfer via conjugation, emerge as promising candidates for the development of efficient bioinoculants and sustainable agricultural bioproducts. Our in silico analyses provide initial evidence that these elements may carry genes with relevant functions, but their practical effectiveness will depend on experimental validation in future studies.

In this study, 568 complete rhizobial genomes were screened for the presence of ICEs and IMEs using software such as ICEfinder, OriTfinder, CONJScan, and Geneious Prime. A total of 329 putative ICEs were identified, with their chromosomal location confirmed and essential components, such as the type IV secretion system (T4SS), analyzed. The results reveal a variable distribution of ICEs and IMEs across genera, with *Bradyrhizobium* standing out as the genus containing the highest number of ICEs (173), followed by *Agrobacterium* (51) and *Rhizobium* (33). The results indicated that the studied bacteria exhibit a high occurrence of ICEs and IMEs, with notable diversity among genera and species, especially in the genus *Bradyrhizobium* which possesses greater cargo gene diversity, which may contribute to its adaptability in different ecosystems.

Keywords: genomic conjugation; mobilome; plant growth promotion

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>23</b>
Resumo.....	23
Materiais e Métodos.....	27
Resultados e Discussão.....	28
Agradecimentos.....	45
Informações sobre financiamento.....	45
Conflitos de interesse.....	45
Material suplementar.....	45
Conclusão.....	45
Referências bibliográficas.....	47

## INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças climáticas e o crescimento populacional acelerado representam desafios significativos para a agricultura e a segurança alimentar global (JOLÁNKAI et al., 2019). A produção agrícola precisa aumentar em 60% até 2050 para atender à demanda crescente, especialmente em países em desenvolvimento, que enfrentam a degradação ambiental e a escassez de recursos naturais (MALHI; KAUR; KAUSHIK, 2021). As alterações climáticas afetam a produtividade das colheitas, com previsões de quedas na produção de cereais como milho e trigo (MAJA; AYANO, 2021), além de intensificarem a competição por recursos como água e terra, resultando na superexploração dos agroecossistemas (QI, 2023). No Brasil, o custo elevado dos fertilizantes agrava ainda mais a situação da segurança alimentar. A ONU (Organização das Nações Unidas) estabelece objetivos claros para promover o Desenvolvimento Sustentável, incluindo a erradicação da fome e a promoção de práticas agrícolas sustentáveis, que são essenciais para enfrentar os desafios impostos pelas mudanças climáticas e pelo crescimento populacional. (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2025).

A família Rhizobiaceae desempenha um papel fundamental na fixação biológica de nitrogênio (FBN), um processo essencial para o crescimento de culturas agrícolas como a soja (*Glycine max*) e o feijão (*Phaseolus vulgaris*). O Brasil atualmente é o maior produtor mundial de soja (EMBRAPA, 2025), e o feijão é uma importante fonte de proteína para a população. Diversas bactérias da família Rhizobiaceae estabelecem uma simbiose com leguminosas, formando nódulos radiculares onde o nitrogênio atmosférico é convertido em formas utilizáveis pela planta, por meio da ação da enzima nitrogenase (Mus et al., 2016).

Embora muitas bactérias dessa família formem nódulos nas raízes das leguminosas, algumas espécies fixam nitrogênio sem formar nódulos, vivendo de maneira livre no solo. Essas bactérias não noduladoras também são importantes para a saúde do solo, contribuindo para a disponibilidade de nitrogênio para outras plantas (Masson-Boivin et al., 2009). O estudo dessas espécies, nodulantes e não nodulantes, tem potencial para o desenvolvimento de bioinoculantes mais eficientes, capazes de promover uma agricultura mais sustentável (Laguerre et al., 2003). O potencial genético das bactérias da família Rhizobiaceae, no entanto, ainda é pouco explorado, especialmente no que se refere aos elementos genéticos móveis, como os ICEs (Elementos Integrativos e Conjugativos).

Os ICEs são elementos genéticos que residem no cromossomo do hospedeiro, com a capacidade de serem excisados e transferidos por conjugação. Estudar esses elementos

como mecanismos de dispersão de genes é particularmente interessante, pois eles combinam as vantagens de diferentes tipos de elementos móveis, como plasmídeos e fagos, mas com maior estabilidade. Ao permanecerem integrados no cromossomo, os ICEs garantem sua estabilidade durante a divisão celular ao mesmo tempo que podem ser auto transmitidos por transferência horizontal para outras células. Além disso, os ICEs transportam uma variedade de genes acessórios, incluindo aqueles relacionados à resistência antimicrobiana, virulência e adaptação ambiental, o que proporciona uma rápida vantagem adaptativa e favorece a colonização de novos nichos ecológicos. Dessa forma, os ICEs desempenham um papel crucial na evolução bacteriana e na diversidade genética entre cepas, moldando o genoma bacteriano e contribuindo significativamente para a disseminação de genes de resistência. (Burrus & Waldor, 2004; Wozniak & Waldor, 2010; Carraro & Burrus, 2015). Embora utilizem diversos mecanismos para desempenhar suas funções essenciais de integração, excisão, transferência e regulação, existem características distintivas que os definem como um grupo coeso (Wozniak & Waldor, 2010).

A caracterização dos ICEs, incluindo seus componentes principais, é fundamental para compreender sua função e impacto na dinâmica genética bacteriana. Em sua estrutura geral, os ICEs são geralmente constituídos por uma região central que abriga genes essenciais para sua mobilidade, integração e conjugação, que é frequentemente mediada pelo sistema de secreção tipo IV (T4SS) em bactérias Gram-negativas. Além disso, os ICEs contêm sequências repetidas que facilitam a integração e excisão, como os sítios attB e attP, que são fundamentais para a recombinação específica do sítio. O tamanho dos ICEs pode variar entre aproximadamente 20 kb a mais de 500 kb, e eles são encontrados em uma ampla gama de espécies bacterianas (Johnson & Grossman, 2015).

Para que um elemento genético móvel seja considerado um ICE potencialmente ativo é necessário que estejam presentes alguns componentes essenciais. São eles:

1. **Sítios de inserção:** Também conhecidos como sítios de att (attL e attR), são regiões específicas do DNA que definem os limites dos ICEs. Esses sítios são essenciais para a inserção e excisão dos ICEs, processos mediados pela integrase através da recombinação sítio-específica entre repetições diretas. A maioria dos ICEs relatados está inserida na extremidade 5' de tRNAs, com os sítios de inserção localizados entre o tRNA e o gene da integrase (Gonçalves & Santana, 2022).
2. **Módulos de Integração, Excisão e Manutenção:** Os ICEs possuem um conjunto de genes essenciais para sua integração, excisão e estabilidade no genoma do

hospedeiro. O módulo de integração/excisão inclui os genes *int* (integrase), responsável pela integração do ICE no cromossomo bacteriano, e *xis* (excisase), que permite sua excisão para formar uma molécula circular durante a transferência conjugativa (Wozniak & Waldor, 2010; Bean et al., 2021). Além disso, o módulo de manutenção assegura a estabilidade do ICE ao longo do tempo, podendo incluir: Sistemas de partição (para distribuição adequada durante a divisão celular), Sistemas toxina-antitoxina (que favorecem a retenção do ICE na população) e Mecanismos de resolução de multímeros (mantendo-o em cópia única) (Ryan et al., 2016; Johnson & Grossman, 2015; Delavat et al., 2017).

Em alguns casos, o ICE pode apresentar capacidade de replicação autônoma, similar a plasmídeos (Hughes-Games et al., 2020). Esse conjunto de mecanismos permite a propagação vertical (mantendo o ICE integrado e silencioso na maioria das células) e horizontal (quando ativado em condições favoráveis), contribuindo para sua persistência e disseminação em populações bacterianas.

3. **Genes de Integração e Excisão:** ICEs devem ter genes que codificam uma integrase, que facilita a integração do elemento no genoma do hospedeiro, e uma excisase, que permite a excisão do ICE do cromossomo para formar uma molécula de DNA circular durante a transferência conjugativa (Wozniak & Waldor, 2010; Bean, Herman, & Grossman, 2021).
4. **Origem de Transferência (*oriT*) e Relaxase:** Para a transferência conjugativa, ICEs precisam de uma origem de transferência (*oriT*) e uma relaxase. A relaxase faz um corte específico na *oriT*, iniciando a transferência de uma fita simples de DNA para a célula receptora (Lee & Grossman, 2007).
5. **Sistema de Secreção Tipo IV (T4SS):** Este sistema é essencial para a transferência do DNA durante a conjugação. Ele forma um canal através do qual a fita simples de DNA do ICE é translocada para a célula receptora (Gong, 2015; Ib & Dv, 2015).
6. **Genes de Regulação:** Os ICEs possuem genes que regulam a excisão, integração e expressão de outros genes necessários para a manutenção e transferência do ICE. Estes genes garantem que a excisão e a transferência ocorram em resposta a sinais específicos, como dano ao DNA ou presença de alguma substância (Ryan, Carraro, Slattery, & Pembroke, 2023).

Os ICEs se replicam passivamente com o cromossomo do hospedeiro, ao contrário dos plasmídeos que se replicam de forma autônoma. Esta integração garante que os ICEs

sejam replicados junto com o DNA do hospedeiro durante a divisão celular, aumentando a estabilidade e manutenção dentro da população bacteriana (Lee et al., 2010; Wright, Johnson, & Grossman, 2015). Os ICEs exibem maior estabilidade quando integrados ao cromossomo, pois dependem dos mecanismos de replicação cromossômica e não necessitam dos complexos sistemas de partição frequentemente encontrados em plasmídeos para garantir sua distribuição às células filhas (Burrus, 2015).

Durante a conjugação, os ICEs se excisam do cromossomo, esse processo é catalisado por uma recombinase específica, geralmente chamada de integrase, que facilita a excisão dos ICEs do genoma do hospedeiro. A excisão envolve um evento de recombinação entre sítios específicos attL e attR resultando na formação de um produto circular do ICE. Esta forma circular é transferida para células receptoras onde se integra ao cromossomo do novo hospedeiro. Este ciclo de integração-excisão assegura a transferência horizontal eficiente de genes e manutenção estável nas células receptoras, um processo que não é típico para plasmídeos que existem independentemente do cromossomo (Lee, Thomas, & Grossman, 2012).

A regulação da excisão é frequentemente controlada por sistemas de expressão bistáveis, o que leva à diferenciação de uma subpopulação de células hospedeiras (Delavat et al., 2017). Essa regulação permite que os ICEs respondam a diversos fatores de estresse, como danos ao DNA, que podem induzir a excisão. Alguns ICEs também possuem sistemas regulatórios complexos que controlam a expressão de genes de excisão, garantindo que a excisão ocorra sob condições específicas (Ryan et al., 2016; Bean et al., 2022).. Esse processo é importante não apenas para a transferência horizontal do ICE para novas células hospedeiras, mas também para permitir que o ICE escape de células hospedeiras em condições desfavoráveis, contribuindo para a disseminação de genes adaptativos, como a resistência a antibióticos.

Durante a excisão ocorre a recombinação entre os sítios attL (*left attachment site*) e attR (*right attachment site*). Essa recombinação gera os sítios attB na bactéria e attP no ICE circular. Quando o ICE se reintegra ao genoma, a integrase média a recombinação entre o DNA circular do ICE (attP) e os sítios attB do hospedeiro, restaurando a integração do elemento genético no cromossomo da célula hospedeira. Esse mecanismo de reintegração assegura que o ICE possa propagar entre diferentes células, garantindo sua persistência e disseminação (Bean et al., 2022).

Além dos fatores mencionados, a regulação da atividade dos ICEs é influenciada por condições ambientais, como variações na temperatura e na disponibilidade de nutrientes. Essas condições podem afetar a expressão dos genes envolvidos na mobilização dos ICEs, evidenciando a complexidade dos mecanismos que governam a transferência horizontal de genes em populações bacterianas. A interação entre fatores ambientais e a resposta SOS pode criar um ambiente propício para a mobilidade genética, permitindo que as bactérias se adaptem rapidamente a novas pressões seletivas (Beaber, Hochhut, & Waldor, 2004; Ryan, Armshaw, & Pembroke, 2016).

Um exemplo marcante é o ICE *ICEMI SymR7A*, identificado em *Mesorhizobium loti* R7A, que contém genes essenciais para a fixação de nitrogênio e a formação de nódulos em *Lotus japonicus*. Esse elemento genético é capaz de transferir a capacidade simbiótica para outras bactérias, permitindo que linhagens originalmente não fixadoras se tornem simbiontes de leguminosas. Estudos comparativos mostram que esses EGMs (Elementos genéticos móveis) evoluíram a partir de um ancestral comum, adquirindo genes adicionais enquanto mantinham elementos essenciais para a fixação de nitrogênio e transferência horizontal de genes (Kelly et al., 2014).

Historicamente, a investigação dos genes cargo e sua transferência resultou na identificação dos ICEs. Esses elementos carregam genes essenciais envolvidos na integração, excisão, manutenção, regulação e conjugação, organizados em estruturas modulares diversas. Além disso, genes cargos com funções não diretamente relacionadas ao ciclo de vida do ICE podem conferir vantagens ou fenótipos distintos aos seus hospedeiros, proporcionando benefícios seletivos significativos. A descoberta dos ICEs foi impulsionada pelos fenótipos específicos que conferem, como resistência a antibióticos, tolerância a metais pesados e capacidade de degradar compostos aromáticos (Xia et al., 2019). Outros benefícios incluem a habilidade de colonizar hospedeiros eucarióticos, fixação de nitrogênio, aumento da virulência e formação de biofilmes (Aslam et al., 2018). Recentemente, os ICEs têm sido identificados por meio de análise de sequências, embora muitas vezes não seja claro quais benefícios exatos esses elementos proporcionam aos seus hospedeiros. Assim, nossa compreensão atual dos fenótipos codificados pelos ICEs pode ser distorcida pela ênfase seletiva em ICEs associados a fenótipos específicos (Lewis, 2008). A biologia dos ICEs pode ser abordada sob perspectivas tanto mecanicistas quanto evolutivas, explorando os mecanismos de transferência, o processamento dos ICEs após a integração em transconjugantes e o papel dos genes hospedeiros. Esta abordagem também

revela *insights* sobre a evolução dos ICEs, suas interações com outros elementos genéticos móveis e sua adaptação a diferentes nichos ambientais. (Gonçalves, de Assis, & Santana, 2022; Wozniak & Waldor, 2010).

Dentro dos genomas bacterianos, também se encontram os Elementos Mobilizáveis e Integrativos (IMEs). Embora compartilhem algumas semelhanças com os ICEs, como a capacidade de se integrar e excisar do genoma hospedeiro, apresentam diferenças funcionais significativas. Ao contrário dos ICEs, que são autossuficientes em sua transferência por conjugação, os IMEs não possuem essa autonomia. Eles dependem de outros elementos conjugativos, como ICEs ou plasmídeos conjugativos, para realizar a transferência entre células bacterianas. Os IMEs são geralmente menores que os ICEs, variando de 2 a 50 kb, e contém módulos para manutenção, mobilização, regulação e funções relacionadas à *fitness*. A principal diferença em relação aos ICEs é que os IMEs possuem um módulo de mobilização, ao invés de um módulo de conjugação. Embora careçam da maquinaria completa para conjugação, os IMEs desempenham um papel significativo na evolução e adaptação bacteriana, uma vez que podem carregar genes de resistência a antibióticos, fatores de virulência e vias metabólicas especializadas. Essas características tornam os IMEs importantes para a evolução bacteriana, mesmo que dependam de outros elementos para a transferência conjugativa (Coluzzi et al., 2017; Lao et al., 2022).

Como estudo inicial exploratório, ao investigar a presença e os possíveis papéis desses EGMs essa pesquisa visa fornecer bases científicas que, em conjunto com futuros estudos, poderão subsidiar o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas voltadas à melhoria da qualidade do solo e da segurança alimentar, especialmente em contextos de mudanças climáticas e crescimento populacional. A capacidade dos ICEs de facilitar a transferência de genes benéficos, como os relacionados à fixação biológica de nitrogênio e resistência a fatores ambientais adversos, pode representar uma solução promissora para os desafios enfrentados pela agricultura moderna. Assim, compreender os ICEs presentes nas bactérias da família Rhizobiaceae pode oferecer novas oportunidades para explorar sua plasticidade genética e aplicá-las no desenvolvimento de bioinoculantes mais eficientes. Essa abordagem tem o potencial de aumentar a produtividade agrícola ao mesmo tempo em que reduz o impacto ambiental, contribuindo para uma agricultura mais sustentável (Jain & Pandey, 2020). Para compreender melhor o papel dos ICEs na transferência de seus genes cargo, visando *insights* para o desenvolvimento de bioprodutos que melhorem a

qualidade do solo e promovam crescimento de plantas, este estudo explorou, utilizando ferramentas de bioinformática, a presença e as características dos elementos integrativos e conjugativos em espécies de bactérias rizobiais dos gêneros *Sinorhizobium*, *Neorhizobium*, *Georhizobium*, *Mesorhizobium*, *Pararhizobium*, *Shinella*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Ciceribacter*, *Endobacterium*, *Ensifer*, *Liberibacter*, *Mycoplana*, *Peteryoungia*, *Pseudorhizobium*, *Ferraniclubacter*, *Gellertiella* e *Xaviernesmea*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aslam, F., Yasmin, A., & Thomas, T. (2018). Essential Gene Clusters Identified in *Stenotrophomonas* MB339 for Multiple Metal/Antibiotic Resistance and Xenobiotic Degradation. *Current Microbiology*, 75, 1484 - 1492. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1549-2>.

Beaber, J., Hochhut, B., & Waldor, M. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427, 72-74. <https://doi.org/10.1038/nature02241>.

Bean, E., Herman, C., & Grossman, A. (2021). Biology and engineering of integrative and conjugative elements: Construction and analyses of hybrid ICEs reveal element functions that affect species-specific efficiencies. *PLoS Genetics*, 18. <https://doi.org/10.1101/2021.12.16.473081>.

Bruns, H., Crüsemann, M., Letzel, A., Alanjary, M., McInerney, J., Jensen, P., Schulz, S., Moore, B., & Ziemert, N. (2017). Function-related replacement of bacterial siderophore pathways. *The ISME Journal*, 12, 320 - 329. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.137>.

Carraro, N., Poulin, D., & Burrus, V. (2015). Replication and Active Partition of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 Family: The Line between ICEs and Conjugative Plasmids Is Getting Thinner. *PLoS Genetics*, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005298>.

Colombi, E., Perry, B., Sullivan, J., Bekuma, A., Terpolilli, J., Ronson, C., & Ramsay, J. (2021). Comparative analysis of integrative and conjugative mobile genetic elements in the genus *Mesorhizobium*. *Microbial Genomics*, 7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000657>.

Crits-Christoph, A., Bhattacharya, N., Olm, M., Song, Y., & Banfield, J. (2020). Transporter genes in biosynthetic gene clusters predict metabolite characteristics and siderophore activity. *Genome research*. <https://doi.org/10.1101/gr.268169.120>.

Crits-Christoph, A., Diamond, S., Butterfield, C., Thomas, B., & Banfield, J. (2018). Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis. *Nature*, 558, 440 - 444. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0207-y>.

Cury, J., Touchon, M., & Rocha, E. (2017). Integrative and conjugative elements and their hosts: composition, distribution and organization. *Nucleic Acids Research*, 45, 8943 - 8956. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx607>.

Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N., & van der Meer, J. R. (2017). The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(4), 512-537. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux008>.

Díaz-Rodríguez, A., Gastelum, L., Pablos, C., Parra-Cota, F., Santoyo, G., Puente, M., Bhattacharya, D., Mukherjee, J., & Santos-Villalobos, S. (2021). The Current and Future Role of Microbial Culture Collections in Food Security Worldwide. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.614739>.

Flynn KJ, Swanson MS. (2014). Integrative conjugative element ICE-box confers oxidative stress resistance to *Legionella pneumophila* in vitro and in macrophages. *mBio*, 5(3):e01091-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01091-14>.

Gonçalves, O. S., de Assis, J. C. S., & Santana, M. F. (2022). Breaking the ICE: an easy workflow for identifying and analyzing integrative and conjugative elements in bacterial genomes. *Functional and Integrative Genomics*, 22(6). <https://doi.org/10.1007/s10142-022-00903-2>.

Haskett, T., Ramsay, J., Bekuma, A., Sullivan, J., O'Hara, G., & Terpolilli, J. (2017). Evolutionary persistence of tripartite integrative and conjugative elements. *Plasmid*, 92, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.06.001>.

Haskett, T., Terpolilli, J., Bekuma, A., O'Hara, G., Sullivan, J., Wang, P., Ronson, C., & Ramsay, J. (2016). Assembly and transfer of tripartite integrative and conjugative genetic elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 12268 - 12273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613358113>.

Johnson, C. M.; Grossman, A. D. (2015). Integrative and conjugative elements (ICEs): What they do and how they work. *Annual Review of Genetics*, 49(1), 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-054913>

Jolánkai, M., Birkás, M., Tarnawa, Á., & Kassai, K. (2019). Agriculture and climate change. *International Climate Protection*.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-03816-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-03816-8_10).

Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C. et al. Genome sequence of the Lotus spp. microsymbiont Mesorhizobium loti strain R7A. *Stand in Genomic Sci* 9, 6 (2014).  
<https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-6>

Lao, J., Lacroix, T., Guédon, G., Coluzzi, C., Payot, S., Leblond-Bourget, N., & Chiapello, H. (2022). ICEscreen: a tool to detect Firmicute ICEs and IMEs, isolated or enclosed in composite structures. *NAR Genom Bioinform*, 4(4), lqac079.  
<https://doi.org/10.1093/nargab/lqac079>.

Lee, C., & Grossman, A. (2007). Identification of the Origin of Transfer (oriT) and DNA Relaxase Required for Conjugation of the Integrative and Conjugative Element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 189, 7254 - 7261.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00932-07>.

Lee, C., Thomas, J., & Grossman, A. (2012). The *Bacillus subtilis* Conjugative Transposon ICEBs1 Mobilizes Plasmids Lacking Dedicated Mobilization Functions. *Journal of Bacteriology*, 194, 3165 - 3172. <https://doi.org/10.1128/JB.00301-12>.

Lee, C. A., Thomas, C. M., & Grossman, A. D. (2012). Conjugation: A Mechanism for the Horizontal Transfer of Genetic Material. In *Microbial Evolution and Co-Adaptation* (pp. 399–424). Washington, DC: American Society of Microbiology.

Li, X., Du, Y., Du, P., Dai, H., Fang, Y., Li, Z., Lv, N., Zhu, B., Kan, B., & Wang, D. (2016). SXT/R391 integrative and conjugative elements in *Proteus* species reveal abundant genetic diversity and multidrug resistance. *Scientific Reports*, 6.  
<https://doi.org/10.1038/srep37372>.

Malhi, G., Kaur, M., & Kaushik, P. (2021). Impact of Climate Change on Agriculture and Its Mitigation Strategies: A Review. *Sustainability*.  
<https://doi.org/10.3390/SU13031318>.

Maja, M., & Ayano, S. (2021). The Impact of Population Growth on Natural Resources and Farmers' Capacity to Adapt to Climate Change in Low-Income Countries. *Earth Systems and Environment*, 5, 271 - 283.  
<https://doi.org/10.1007/s41748-021-00209-6>.

Margulies, M., Egholm, M., & Altman, W. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.

Morton, E., & Fischer, M. (2016). Identification and characterization of integrative and conjugative elements in *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), 2149–2158. <https://doi.org/10.1128/AEM.03709-15>.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). [S. l.], 2025. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 26 jun. 2025.

Parvez, M., & Hossain, S. (2020). Strategies to enhance agriculture productivity under climate change. *Agriculture and Food Security*, 9(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40066-020-00246-1>.

Preston, G., & Vance, D. (2022). Genomic characterization of integrative and conjugative elements in foodborne pathogens. *Scientific Reports*, 12, 6546. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10365-4>.

Ragab, D., & Prudhomme, M. (2017). Assessing the effect of climate change on global agricultural yields. *Nature*, 542(7642), 265–270. <https://doi.org/10.1038/nature21392>.

Ross, M., & Engelberts, M. (2015). Pseudogenes of bacterial pathogens: types and origins. *Bacterial Molecular Evolution*, 128, 97–108. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09691-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09691-5_7).

Van der Vossen, E., Martins, S., & Ferreira, F. (2014). Environmental Stressors Affecting Microbial Communities in Agricultural Systems: a Comparative Analysis of Key Microbial Interactions. *Environmental Microbiology*, 16, 417-426. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12468>.

Verner, D., Šnajdrová, L., & Novák, L. (2022). Management of integrative conjugative elements in industrial biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(4), 461-474. <https://doi.org/10.1007/s10295-021-02673-3>.

Wu, X., Zhang, X., & Zhang, J. (2020). Integrative and Conjugative Elements: Insight into Their Functionality, Evolution, and Contribution to the Genetic Diversification of Bacteria. *Microorganisms*, 8, 1571. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101571>.

Zhang, C., Zhang, L., & Zhang, Y. (2021). Characterization and applications of integrative and conjugative elements in microbial genetic engineering. *Microorganisms*, 9, 124. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010124>.

Zhou, Y., & He, Y. (2019). Comparative analysis of integrative and conjugative elements from *Bacillus* species and other gram-positive bacteria. *Bioinformatics*, 35(12), 2112–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz067>.

Zong, Z., Zhang, Z., & He, D. (2016). Detection of integrative and conjugative elements by a real-time PCR method. *Microbial Pathogenesis*, 97, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.005>.

## CAPÍTULO 1

### UMA ANÁLISE DO POTENCIAL GENÉTICO DE ICEs E IMEs EM RIZÓBIOS

#### **Resumo**

Práticas agrícolas sustentáveis são um dos maiores desafios da atualidade, especialmente no que diz respeito ao uso de bioinoculantes para promover o crescimento das plantas. Este estudo investigou o papel dos Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) e dos Elementos Mobilizáveis e Integrativos (IMEs) presentes em bactérias rizobiais, especialmente em gêneros da família *Rhizobiaceae*, e como os genes associados a esses elementos contribuem para a adaptação bacteriana e o crescimento vegetal. Utilizando ferramentas bioinformáticas, foram identificados 329 ICEs putativos em 567 genomas completos, revelando variações consideráveis na presença e diversidade desses elementos entre os gêneros estudados. O gênero *Bradyrhizobium* se destacou como o mais abundante em ICEs, além de apresentar uma grande diversidade de sequências de IMEs. Em relação aos genes associados ao crescimento das plantas, a pesquisa evidenciou uma predominância de genes relacionados à fixação de nitrogênio, resistência a estresses ambientais e promoção do crescimento vegetal. Esses resultados sugerem que os ICEs desempenham um papel significativo na adaptação das bactérias a diferentes ambientes, podendo também, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de bioinoculantes eficazes para a agricultura sustentável. Conclui-se portanto que a compreensão dos ICEs e dos genes associados ao crescimento de plantas abre novas perspectivas para a biotecnologia agrícola, com potencial para melhorar a produtividade e a sustentabilidade nos sistemas agrícolas.

#### **Declaração de Impacto**

Este estudo revela a ampla distribuição e a diversidade funcional dos ICEs, destacando seu papel crucial na promoção do crescimento das plantas. Ao identificar e caracterizar 329 ICEs putativos, o trabalho não apenas contribui para o entendimento da genética bacteriana, mas também abre novas perspectivas para a biotecnologia agrícola. A capacidade dos ICEs de carregar genes acessórios que favorecem a adaptação e a interação simbiótica com plantas, bem como de disseminar esses genes na natureza, pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a produtividade agrícola e a sustentabilidade dos ecossistemas. Assim, os resultados deste estudo exploratório inicial

podem impulsionar o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas baseadas em ICEs, como a engenharia de bactérias portadoras de genes que favorecem a fixação de nitrogênio, a tolerância a estresses abióticos (ex.: seca, salinidade) ou a supressão de patógenos vegetais. Tais avanços poderão reduzir a dependência de fertilizantes químicos e agrotóxicos, aumentar a resistência das culturas a condições ambientais adversas e contribuir para a recuperação de solos degradados – promovendo, assim, uma agricultura mais produtiva e sustentável, com menores impactos ecossistêmicos.

### **Palavras-chave**

Conjugação, Genômica, Mobiloma, Promoção de crescimento vegetal.

### **Introdução**

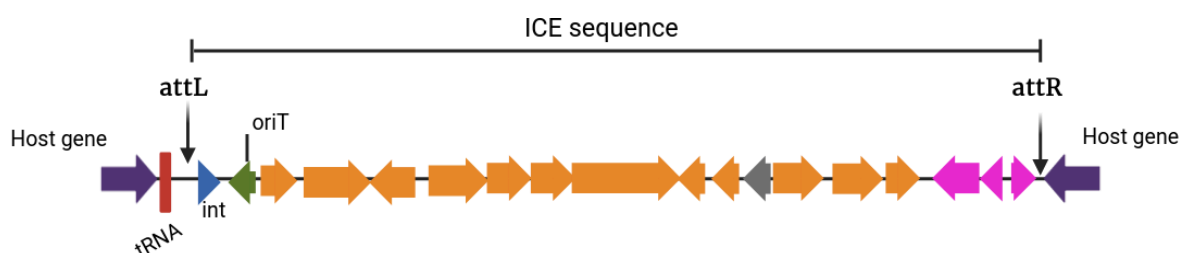
O aumento da população mundial, previsto para alcançar 9,7 bilhões até 2050, impõe um desafio significativo à produção agrícola, especialmente em países em desenvolvimento, onde será necessário um crescimento de 77% na produção de alimentos (Qi, 2023). Esse aumento precisa ocorrer de forma sustentável, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos, que apresentam altos custos e impactos ambientais negativos. Paralelamente, práticas agrícolas convencionais têm agravado a degradação do solo e a vulnerabilidade das culturas a estresses ambientais, como secas e pragas (Maja & Ayano, 2021).

Nesse contexto, a adoção de práticas mais sustentáveis, como o uso de bioinsumos e biotecnologias, é essencial para promover a produtividade agrícola sem comprometer os recursos naturais. A diversidade genética da microbiota do solo, por exemplo, pode melhorar a fertilidade e a saúde das plantas, reduzindo a necessidade de insumos químicos. A ONU (Organização das Nações Unidas) destaca a importância de iniciativas agrícolas sustentáveis para garantir a segurança alimentar global, promovendo práticas que conservem os ecossistemas e mitiguem os impactos da intensificação agrícola (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2025.). Assim, o desenvolvimento de soluções integrativas, que conciliam aumento de produtividade e sustentabilidade, é crucial frente às demandas futuras da agricultura (Qi, 2023).

A exploração do potencial biotecnológico de microrganismos, como aqueles pertencentes à família Rhizobiaceae, representa uma abordagem promissora para a promoção de uma agricultura mais sustentável e resiliente frente aos desafios das

mudanças climáticas. Estes microrganismos desempenham papéis essenciais no ciclo de nutrientes, especialmente na fixação biológica de nitrogênio, um processo que reduz a necessidade de fertilizantes nitrogenados sintéticos e contribui para a saúde do solo (Lindström & Mousavi, 2020). No entanto, a eficácia dessas interações simbióticas pode ser influenciada por diversos fatores abióticos e bióticos, limitando a aplicação universal de certas cepas (Ormeño-Orrillo & Martínez-Romero, 2019).

Nesse contexto, os Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) podem potencializar a adaptação e funcionalidade de microrganismos benéficos, como as bactérias rizobiais, em diferentes condições ambientais. Os ICEs são elementos genéticos móveis que realizam a transferência horizontal de genes (THG) por conjugação, incluindo aqueles responsáveis por características adaptativas, como resistência a estresses ambientais e capacidade de metabolização de compostos específicos (Delavat et al., 2017). A THG é um processo fundamental na adaptação microbiana, permitindo que as bactérias adquiram genes que conferem vantagens seletivas em ambientes desafiadores.



**Figura 1. Representação esquemática de um ICE.** Os genes de carga são representados de forma que os genes em laranja estão relacionados à conjugação, os genes em rosa estão envolvidos na regulação, os genes em azul estão associados à integração e excisão, e os genes em cinza têm funções acessórias ou desconhecidas. Em roxo: genes do hospedeiro; tRNA, RNA de transferência; int, integrase; *oriT*, origem de transferência; attL, attR: sítios de ligação; Fonte: Ilustração original.

Os ICEs possuem uma estrutura modular (Figura 1) que lhes permite se integrar ao cromossomo da célula hospedeira, excisar-se e transferir-se para novas células utilizando sistemas de secreção do tipo IV (T4SS) (Wozniak & Waldor, 2010). Eles carregam genes essenciais para sua manutenção e transferência, além de genes acessórios que conferem vantagens adaptativas aos hospedeiros, como resistência a antibióticos, tolerância a metais pesados e capacidade de formar biofilmes. Esses elementos têm sido historicamente investigados devido aos benefícios seletivos que conferem aos seus hospedeiros, como a capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas ou aumentar a resistência a condições ambientais adversas (Zahran, 1999).

No Brasil, a importância das bactérias rizobiais para a agricultura sustentável é particularmente relevante, dada a dependência da agricultura nacional em culturas como a soja e o feijão, que dependem fortemente da fixação biológica de nitrogênio para seu crescimento. Espécies de bactérias rizobiais, que inclui gêneros como *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, formam simbioses altamente específicas com leguminosas, desempenhando um papel crucial na fertilidade do solo e no crescimento das plantas. A utilização de inoculantes microbianos, baseados em espécies fixadoras de nitrogênio, já é uma prática estabelecida no Brasil, com um mercado robusto de inoculantes para soja (Embrapa soja, 2024). Entretanto, a exploração dos ICEs como potencial ferramenta biotecnológica pode oferecer novas oportunidades para melhorar a eficiência desses bioinoculantes e desenvolver novas soluções para a agricultura sustentável. Um exemplo notável é o ICE ICEMISymR7A, presente na cepa *Mesorhizobium loti* R7A, que carrega genes para nodulação e fixação de nitrogênio (Sullivan et al., 1995). Este ICE pode ser excisado e transferido para outras bactérias do solo, transformando organismos não simbióticos em simbióticos. Esse processo é regulado por um sistema de *quorum sensing* controlado por genes da família *LuxRI* (Ramsay et al., 2009). A excisão e transferência desse ICE são moduladas por fatores ambientais e sinais moleculares, que ativam a expressão de genes específicos e, conseqüentemente, a transferência de toda a ilha simbiótica (Ramsay et al., 2013). Isso permite que as bactérias receptoras adquiram a capacidade de formar nódulos e fixar nitrogênio, aumentando a adaptabilidade e a eficiência dos bioinoculantes em diversos contextos agrícolas. Além disso, a análise comparativa de sequência do ICEMISymR7A revela uma organização altamente conservada, sugerindo um mecanismo evolutivo robusto para a transferência de características simbióticas em diferentes espécies de bactérias do solo (Sullivan et al., 2002).

A aplicação de ICEs em programas de bioengenharia de bactérias rizobiais pode expandir o espectro de adaptação desses microrganismos, promovendo maior resiliência em solos degradados ou sujeitos a estresses hídricos e térmicos. A inserção de ICEs em *Rhizobium spp.*, por exemplo, tem mostrado melhorar a fixação de nitrogênio e a produção de exopolissacarídeos, compostos que favorecem a formação de agregados no solo e aumentam a retenção de água, auxiliando na mitigação da seca. Esses elementos também podem ser projetados para carregar genes de resistência a patógenos e pragas,

proporcionando proteção às culturas sem recorrer ao uso de pesticidas químicos (Bellanger et al., 2014).

A integração de ICEs com práticas agrícolas sustentáveis, por meio da engenharia genética e de estudos baseados em investigações iniciais — como o presente trabalho —, pode impulsionar o desenvolvimento de bioinsumos mais eficazes e adaptáveis, contribuindo para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Nesse cenário, a prospecção de novas cepas e o entendimento das dinâmicas ecológicas e evolutivas associadas ao uso de ICEs são áreas de pesquisa prioritárias para otimizar os benefícios dessa tecnologia (Gonçalves et al., 2020).

Existem ainda nos genomas das bactérias elementos genéticos semelhantes à ICEs denominados de IMEs. Ao contrário dos ICEs, que possuem autonomia para transferência genética por conjugação, os IMEs não possuem tra/trb (sistema de formação de pares conjugativos), dependendo de elementos auxiliares, como ICEs ou plasmídeos, para realizar essa transferência (Garcillán-Barcia et al., 2020). Embora menores e menos auto-suficientes, os IMEs também podem carregar genes acessórios (Johnson et al., 2016). A compreensão mais aprofundada desses elementos pode fornecer novos *insights* para o desenvolvimento de bioprodutos que promovam o crescimento das plantas, melhorem a qualidade do solo e aumentem a resiliência dos agroecossistemas diante das mudanças ambientais.

## **Materiais e Métodos**

### **Identificação e caracterização de ICEs e IMEs**

Em agosto de 2023, foram baixados do NCBI 568 genomas completos das bactérias rizobiais (Tabela S1) representando 20 gêneros. Os genomas foram analisados com o software ICEfinder (Liu et al., 2019) para identificar sequências relacionadas aos ICEs e IMEs. As sequências terminais *attL* e *attR* foram identificadas pelo programa ICEfinder, ou por alinhamento das extremidades do elemento ou por busca de sequências repetitivas usando o software Geneious. O software OriTfinder (Li et al., 2018) foi utilizado para identificar sítios de origem de replicação (*OriT*), relaxase, T4SS e T4CP. O software CONJScan (Cury et al., 2020), parte do MacSyFinder, detectou componentes do sistema T4SS.

A identificação e anotação dos genes cargos relacionados à promoção de crescimento vegetal foi realizada utilizando o software antiSMASH (Blin et al., 2023) e

PlaBase (Patz et al., 2021). Definimos os parâmetros essenciais para avaliar a significância dos alinhamentos no BLAST, com critérios de e-value  $\leq 1e-10$  para alinhamentos altamente significativos. Para distinguir entre ICEs conhecidos e novos nas bactérias exploradas, submetemos nossas sequências ao banco de dados IceBerg 3.0 (Wang et al., 2024).

Além disso, para definir o número de ICEs únicas, realizamos uma análise no MegaBLAST entre as sequências utilizando os seguintes parâmetros: cobertura de alinhamento  $\geq 70\%$ , identidade mínima 80% e e-value  $\leq 1e-10$ . A cobertura foi definida em 70% para garantir a detecção confiável de regiões conservadas, enquanto a identidade mínima foi estabelecida para equilibrar a detecção de sequências relevantes e minimizar falsos positivos. O e-value foi configurado para assegurar que as correspondências detectadas fossem estatisticamente significativas.

## **Resultados e Discussão**

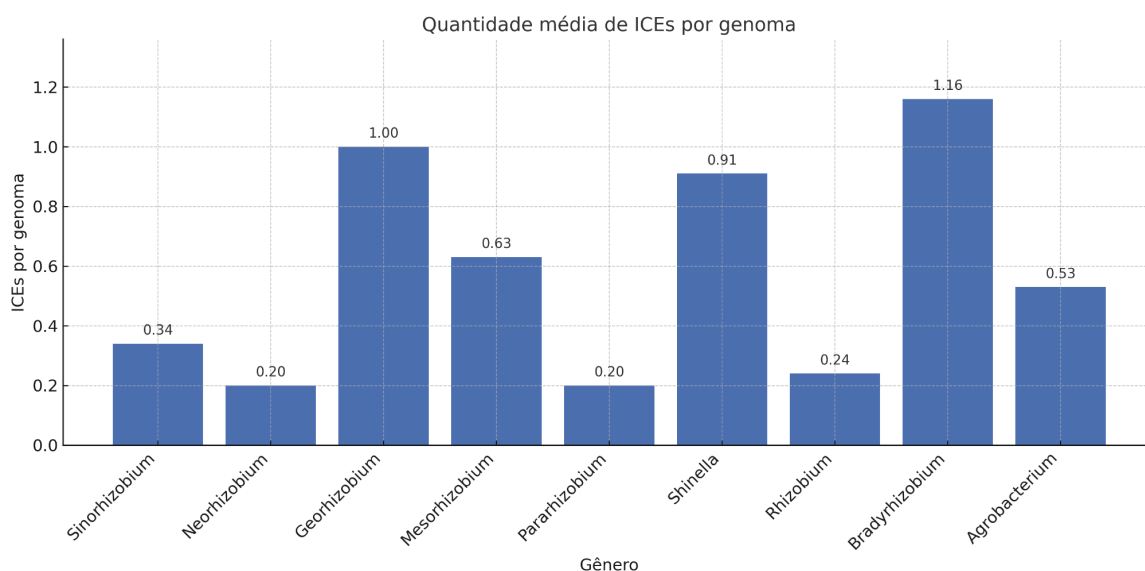
Os dados obtidos revelam uma distribuição variada de Elementos Integrativos e Conjugativos entre os diferentes gêneros e espécies bacterianas de bactérias rizobiais (Figura 2), sugerindo uma complexidade significativa na presença e abundância desses elementos em diferentes contextos taxonômicos.

Foram identificados 329 ICEs putativos em 567 genomas completos analisados, havendo ICEs presentes em 9 dos 20 gêneros analisados (Figura 2 e Tabela S2). Os ICEs apresentaram uma variação de tamanho entre 66 Kb a 249 Kb (Figura 3). A análise do conteúdo GC médio dos cromossomos e ICEs revelou diferenças entre esses componentes genéticos em diversos gêneros bacterianos (Figura 4). A variação no conteúdo de GC dos ICEs pode fornecer informações valiosas sobre sua dinâmica evolutiva e relação com o hospedeiro. ICEs que apresentam um amplo espectro de conteúdo GC podem ser indicativos de uma maior mobilidade e dispersão entre diferentes espécies bacterianas, sugerindo uma natureza mais promíscua e uma capacidade adaptativa ampliada (Frost et al., 2005). Essa plasticidade genética pode estar associada a uma maior frequência de eventos de transferência horizontal, permitindo a aquisição e disseminação de genes de adaptação e resistência a ambientes distintos (Wozniak & Waldor, 2010).

Por outro lado, ICEs cujo conteúdo GC é mais próximo ao do cromossomo da bactéria hospedeira tendem a estar mais adaptados a esse genoma específico. Isso pode indicar que a ICE foi integrada ao genoma hospedeiro há mais tempo, passando por



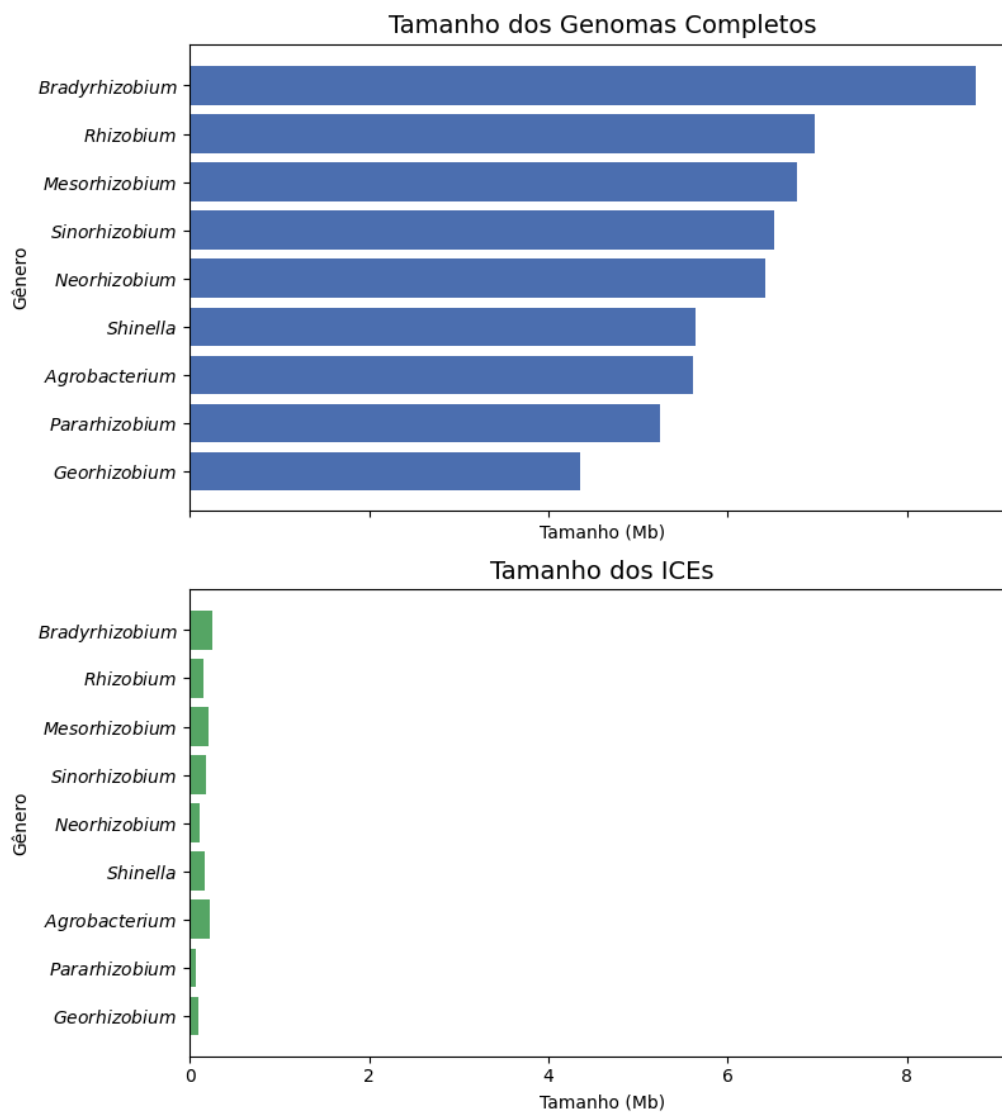
Em uma análise geral, o gênero com o maior número de ICEs identificadas é *Bradyrhizobium*, totalizando 173 ICEs em 149 genomas. Essa alta densidade sugere uma rica diversidade de elementos de carga integrativa dentro deste grupo, destacando a importância de *Bradyrhizobium* na dinâmica dos ICEs em bactérias rizobiais. A predominância de ICEs no gênero *Bradyrhizobium* pode indicar uma robusta capacidade de adaptação e uma elevada propensão para a transferência genética horizontal. Além disso, gêneros como *Agrobacterium* e *Mesorhizobium* também demonstram quantidades significativas de ICEs, com 53,1% e 63,1% dos genomas analisados contendo ICEs, respectivamente (Tabela S3, Figura 3).



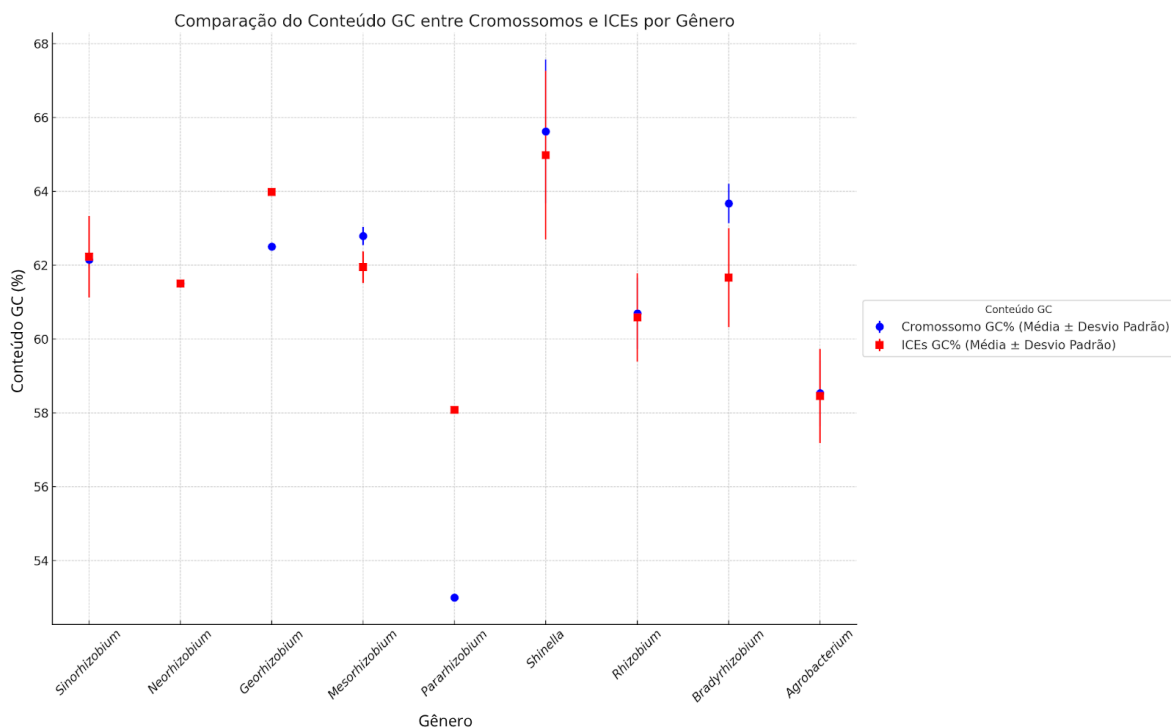
**Figura 3:** Distribuição de elementos integrativos e conjugativos (ICEs) identificados em diferentes gêneros e espécies de bactérias analisadas. O gráfico apresenta o número total médio relativo de ICEs encontrados em cada genoma, destacando a diversidade de elementos nos gêneros *Sinorhizobium*, *Neorhizobium*, *Georhizobium*, *Mesorhizobium*, *Pararhizobium*, *Shinella*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*.

A presença de ICEs compartilhados entre espécies diferentes reforça a hipótese de um intercâmbio genético significativo dentro da família *Rhizobiaceae*, demonstrando um alto potencial de transferência horizontal de genes. Exemplos dessa distribuição incluem o Grupo 1, que contém ICEs presentes em *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium fabrum* e *Agrobacterium leguminum*, e o Grupo 2, cujos ICEs são encontrados em *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* e *Sinorhizobium fredii*. De maneira similar, ICEs do Grupo 3 são compartilhados entre *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium etli* e *Sinorhizobium meliloti*, enquanto o Grupo 13 inclui ICEs distribuídos entre *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium acidisoli* e *Rhizobium galegae* (Tabela S4). Estudos

demonstram que a ampla distribuição dos ICEs entre diferentes espécies indica que esses elementos atuam como vetores genéticos ativos, permitindo a rápida disseminação de características vantajosas dentro de comunidades bacterianas (Delavat et al., 2017).



**Figura 3.** Comparação entre o tamanho do genoma completo das bactérias analisadas e o tamanho dos ICEs por gênero utilizando a mesma escala.



**Figura 4.** Conteúdo GC de Cromossomos e ICEs de diferentes gêneros de bactérias pertencentes à família Rhizobiaceae.

A análise do CONJScan (Cury et al., 2020) revelou uma uniformidade nos componentes do sistema T4SS (Sistema de secreção Tipo IV) entre os diferentes gêneros bacterianos estudados. A presença consistente de quantidades idênticas de cada tipo de T4SS sugere similaridade na composição dos elementos integrativos e conjugativos (ICEs) entre essas espécies. As relaxases identificadas variam em grupos funcionais e tamanhos. As proteínas T4CP, incluindo *FtsK\_SpoIIIE* e *TrwB\_AAD\_bind*, também exibem diversidade e especialização, o que pode sugerir uma evolução direcionada para funções específicas na conjugação (Smillie et al., 2010). A uniformidade na composição dos componentes do sistema T4SS entre as espécies sugere uma conservação significativa desse sistema fundamental para a conjugação (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Todas as espécies analisadas apresentaram números equivalentes de componentes T4SS, ressaltando a importância desses sistemas na funcionalidade dos ICEs. A presença constante dos diferentes tipos de T4SS sugere que, apesar das variações taxonômicas, os mecanismos de conjugação são amplamente semelhantes, indicando uma estrutura e função comuns entre as espécies (Guglielmini et al., 2011).

Quanto às *OriTs* identificadas, os resultados mostram que essas regiões variam em tamanho, com a maioria das espécies apresentando regiões entre 31 e 57 pb. As repetições

invertidas (IR) foram consistentemente encontradas nas regiões *oriT* dos gêneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, e *Rhizobium*, como exemplificado por *Sinorhizobium fredii* CCBAU 25509, que possui duas IR de 6 pb cada (Tabela 2). Algumas espécies, como *Neorhizobium galegae* e *Georhizobium profundi*, não apresentaram regiões *oriT* preditas. As sequências de nucleotídeos nas regiões *oriT* mostram variações, com padrões conservados, como a presença de "GGCG" e "CGCA" em várias sequências.

A presença de sequências conservadas de *oriT*, juntamente com a variação observada em tamanho e características entre as diferentes espécies, ilustra a complexidade e a dinâmica dos mecanismos de mobilidade genética (Bellanger et al., 2014; Johnson & Grossman, 2015).

Organismo	Coordenadas <i>oriT</i>	Tamanho <i>oriT</i>	Repetições Invertidas (IR)	Sequência <i>oriT</i>
<i>S. mexicanum</i>	4727967..4728005 (+)	39 pb	6 pb: [4727989..4727994] [4727999..4728004]	GGATCCGAAGGGCG CAATTATACGTCGCT GATGCGACGC
<i>S. fredii</i> CCBAU 25509	4239460..4239516 (-)	57 pb	6 pb: [4239462..4239467] [4239481..4239486]	CAGGAAAATGGCGTA GCACATTTTTCCGTAT CCTGCCCTCTAAAT TGTAAGGGGAA
<i>S. americanum</i>	6315743..6315777 (-)	36 pb	7 pb: [6315755..6315761] [6315766..6315772]	AGGGCGCAATATACG TCGCTGGCGCGACG TGCTTG
<i>S. meliloti</i>	5409942..5409972 (+)	32 pb	7 pb: [5409954..5409960] [5409965..5409971]	AGGGCGCAATATACG TCGCTGGCGCGACG TG
<i>M. sp.</i>	788726..788759 (-)	34 pb	6 pb: [788744..788749] [788753..788758]	GAGGGAGGGCGCGC TTATACGTCGTGCCG ACGTG
<i>N. galegae</i> bv. <i>officinalis</i> HAMB1141	6393234..6393266 (+)	33 pb	N/A	CCAAGGGCGCAATTA TACGTCGCTGATACG ACG
<i>R. gallicum</i> bv. <i>gallicum</i> R602sp	4327659..4327703 (+)	45 pb	6 pb: [4327681..4327686] [4327691..4327696]	GGATCCGAAGGGCG CAATTATACGTCGCT GACGCGACGCCCTT GC
<i>R. bangladeshense</i>	5723524..5723562 (+)	39 pb	7 pb: [5723540..5723546] [5723551..5723557]	CCAAGGGCGCAATTA TACGTCGCTGGCGC GACGTGTTGC
<i>B. sp.</i>	1322461..1322490 (-)	31 pb	6 pb: [1322473..1322478] [1322482..1322487]	AGGGGCGCTTATACG TCGTTCCGACGTGC G

**Tabela 2: Regiões *oriT* Putativas em Diferentes Gêneros.** A tabela apresenta as características das regiões *oriT* identificadas em diferentes gêneros bacterianos. Foram destacadas as coordenadas genômicas, o tamanho da sequência *oriT*, a presença de repetições invertidas (IRs) e a sequência nucleotídica correspondente.

A análise das sequências de ICEs revelou a presença de diversos genes cargo, que foram categorizados em efeitos diretos e indiretos, conforme ilustrado nas Figuras 5 e 6. A distinção entre esses efeitos é crucial para compreender como esses genes contribuem para a promoção do crescimento vegetal ou para o aumento do *fitness* bacteriano. Os genes cargo podem conferir vantagens adaptativas às bactérias, como a capacidade de colonizar hospedeiros, resistir a estresses ambientais ou interagir de forma benéfica com plantas. No entanto, é importante destacar que nem todos os genes cargo beneficiam diretamente a planta, alguns podem estar relacionados principalmente à sobrevivência e adaptação da própria bactéria (Hacker e Carniel, 2001; Frost et al., 2005).

Os genes com efeitos diretos foram organizados em sete categorias principais. A biorremediação e degradação de xenobióticos apresentou a maior contagem total entre os efeitos diretos, com genes como *ddpA|ABC\_PE\_S* (42 sequências), envolvido na detoxificação de metais pesados, como o níquel. Já a categoria nutrição e metabolismo de plantas inclui genes responsáveis pela aquisição de nutrientes e solubilização de compostos essenciais, com destaque para *ymfI|fabG|efpI* (42 sequências), relacionado à produção de sideróforos e à aquisição de ferro. A sinalização e resposta ao estresse apresentou genes como *parB|spo0J|yyaA* (41 sequências), associados à sinalização de estresse e controle de biofilmes, processos fundamentais para a adaptação das bactérias a condições adversas (Figura 5). Um exemplo claro é o gene *hsaA*, que apresenta efeitos diretos para bactéria na degradação de compostos aromáticos complexos, como hidrocarbonetos policíclicos. A capacidade desse gene de metabolizar essas substâncias tóxicas confere uma vantagem ecológica às bactérias, permitindo que sobrevivam em ambientes contaminados, o que demonstra um impacto direto na bio-remediação. Esse processo tem sido amplamente estudado em ICEs que carregam genes responsáveis pela degradação de compostos xenobióticos, como os presentes em *Pseudomonas aeruginosa* (Obi et al., 2018).

Outro gene significativo é *acd*, relacionado à produção de fitohormônios, como o ácido indol-3-acético, que estimula o crescimento das raízes das plantas. Esse efeito direto facilita a interação simbiótica com plantas hospedeiras, melhorando sua absorção de nutrientes. A presença de ICEs com genes cargo voltados para a promoção da simbiose também foi documentada em estudos com o gênero *Mesorhizobium*, onde ICEs carregam

genes importantes para a colonização e fixação de nitrogênio em plantas leguminosas (Colombi et al., 2021).

Os ICEs podem atuar tanto direta quanto indiretamente na promoção do crescimento vegetal. Entre os mecanismos diretos, destacam-se genes envolvidos na síntese de fitormônios, como o ácido indolacético (AIA), e enzimas que solubilizam fosfato, que estimulam diretamente o desenvolvimento das plantas ao aumentar a absorção de nutrientes e a tolerância a estresses ambientais (Glick, 2012; Spaepen et al., 2007). Esses genes são frequentemente encontrados em ICEs e podem ser transferidos horizontalmente entre diferentes linhagens bacterianas, ampliando sua capacidade de interagir benéficamente com as plantas.

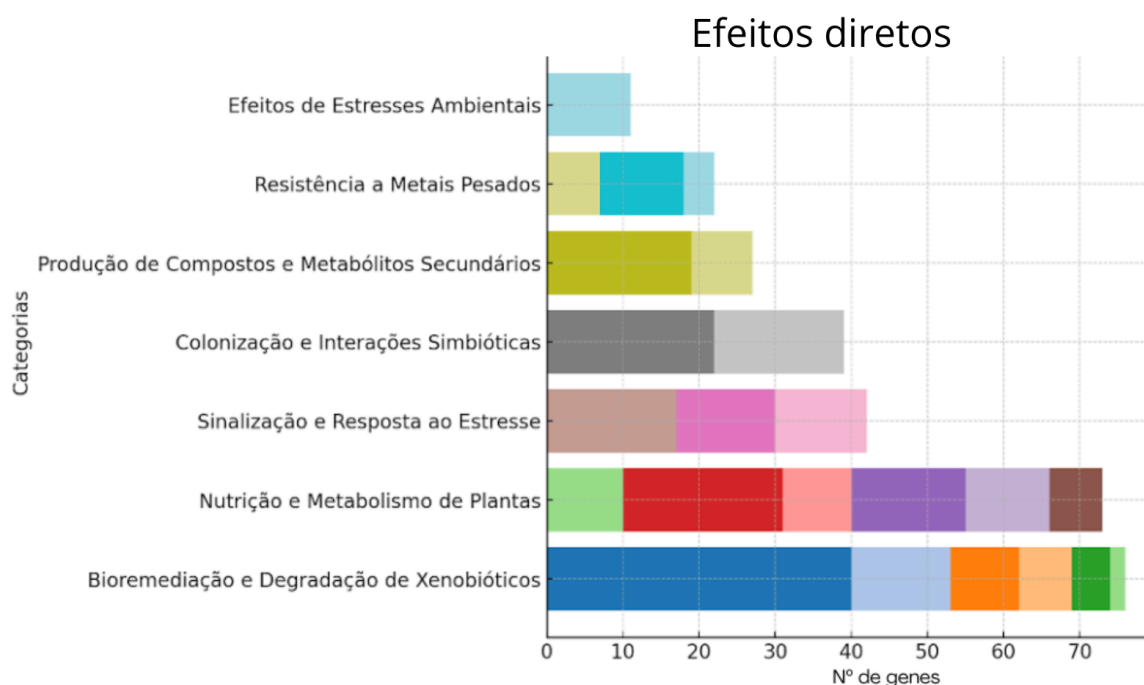
Somado a isso, a colonização e interações simbióticas englobou genes relacionados à colonização de raízes e interações simbióticas entre organismos. Na categoria produção de compostos e metabólitos secundários, foram identificados genes associados à produção de compostos antimicrobianos. A resistência a metais pesados incluiu genes envolvidos na resistência a metais como níquel, ferro e cobre, enquanto a categoria efeitos de estresses ambientais compreendeu genes responsáveis pela adaptação a condições extremas, como salinidade e temperatura.

Entre os efeitos indiretos, os genes identificados foram agrupados em sete categorias principais, com destaque para os processos relacionados ao controle de estresse e à colonização de plantas. O controle de estresse apresentou genes envolvidos na neutralização de estresses abióticos (como seca, salinidade e variações de temperatura) e bióticos (como a presença de patógenos), captura de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sinalização de estresse. O gene *oxyR*, encontrado em 51 sequências, foi o mais representativo nesta categoria, estando diretamente relacionado à resposta antioxidante. Esse gene tem papel na proteção celular contra danos oxidativos, o que pode beneficiar tanto a bactéria quanto a planta hospedeira, ao promover um ambiente menos estressante para o desenvolvimento vegetal (Imlay, 2008; Santos et al., 2012).

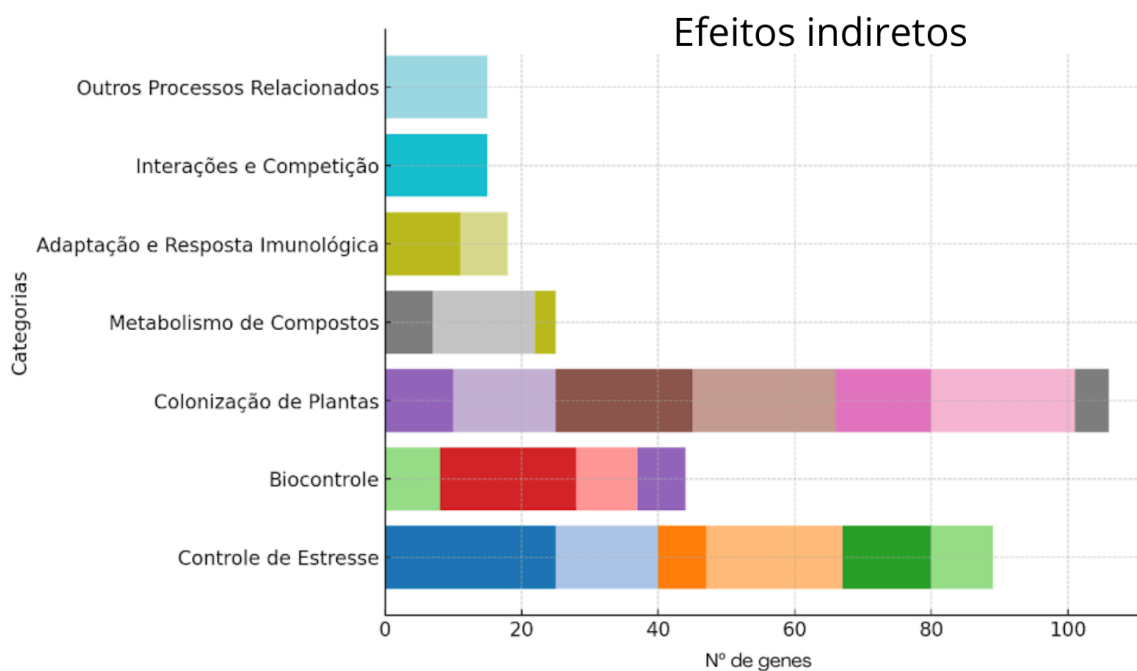
A colonização de plantas foi a categoria com a maior contagem total de genes, abrangendo sistemas relacionados à colonização de raízes e transporte de nutrientes. Na categoria biocontrole, foram identificados genes que atuam no controle biológico e na resposta a organismos competidores. Genes relacionados às interações e competição como os genes do sistema de secreção tipo IV (*trbE*, *trbD*, *trbG* e *trbL*, variando entre 86 e 76 sequências), desempenham papel central em processos de exclusão competitiva e na

modulação da comunicação bacteriana via *quorum sensing* (Figura 5). A categoria adaptação e resposta imune reuniu genes associados a respostas sinalizadoras e mecanismos de defesa contra estresses. O metabolismo de compostos também se destacou, com genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, lipídios e transporte de nutrientes. Outras funções menos frequentes, incluídas na categoria outros processos relacionados, abrangem genes associados a mecanismos de sinalização e metabolismo secundário (Figura 6).

Esses resultados indicam uma ampla diversidade funcional dos genes cargo associados aos ICEs das bactérias rizobiais exploradas, com potencial impacto em processos ecológicos e ambientais.

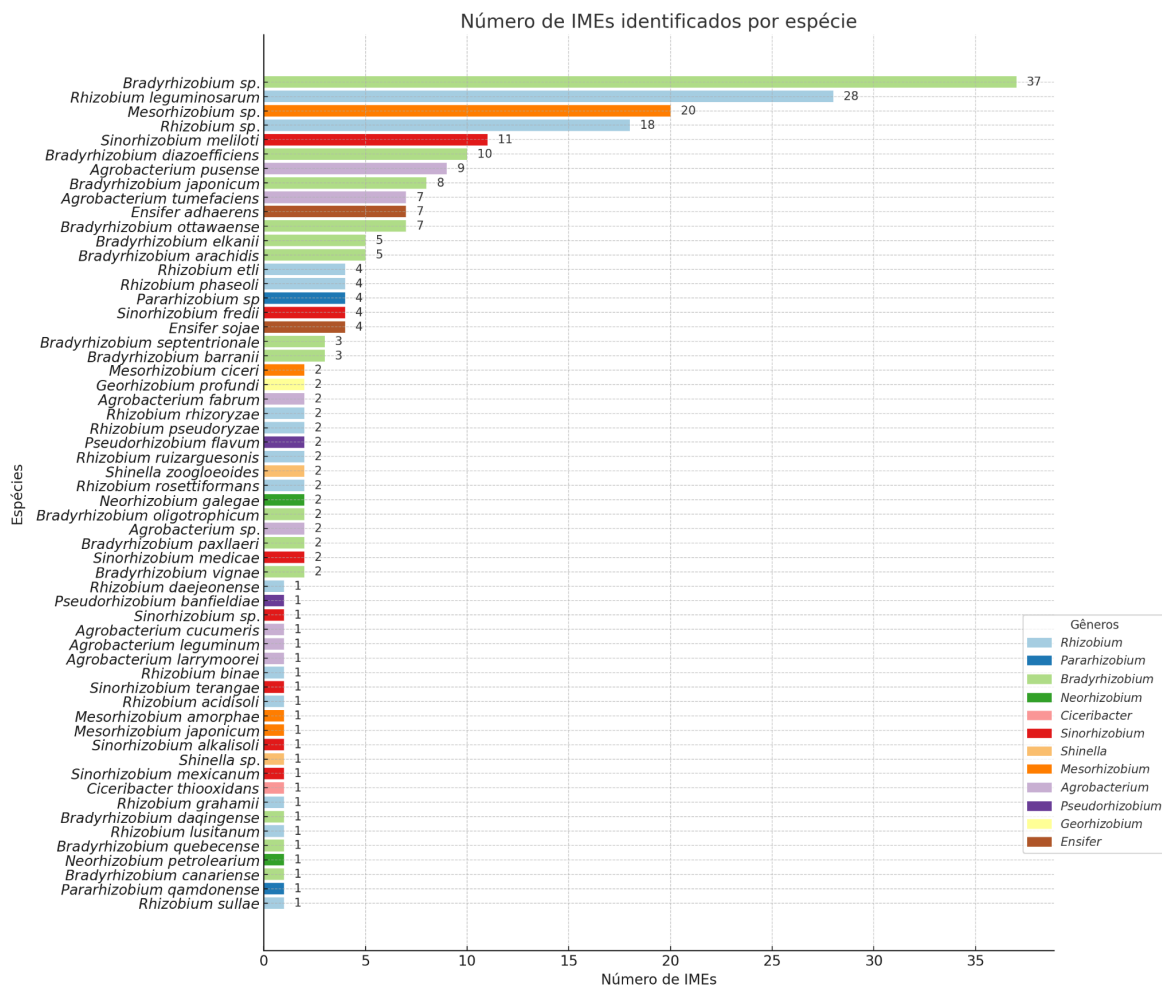


**Figura 5.** Gráfico de barras horizontais empilhadas representando os efeitos diretos de diversas categorias relacionadas aos genes cargos presentes nas sequências dos ICEs encontrados em isolados da família *Rhizobiaceae*. Cada barra corresponde a uma categoria principal. Dentro de cada barra, as subcategorias são representadas por diferentes cores, mostrando a diversidade e a quantidade de subcategorias associadas a cada efeito. O eixo X indica a contagem total de genes dentro de cada categoria, enquanto o eixo Y lista as categorias principais.



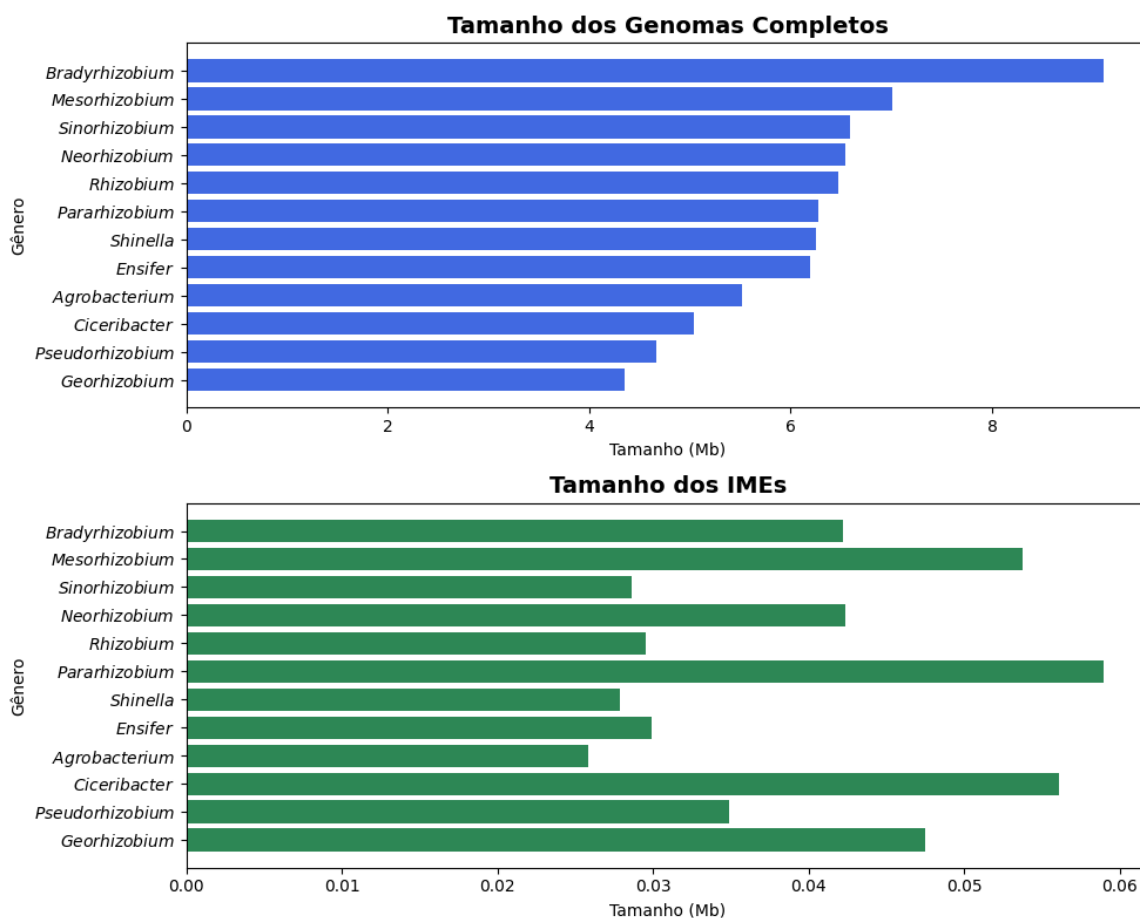
**Figura 6.** Gráfico de barras horizontais empilhadas mostrando os efeitos indiretos organizados em categorias relacionadas aos genes cargos presentes nas sequências dos ICEs encontrados em isolados da família *Rhizobiaceae*. As categorias principais são representadas por barras horizontais empilhadas, com subcategorias coloridas que indicam diferentes efeitos específicos. O eixo X reflete o número de genes relacionados a cada categoria, enquanto o eixo Y exibe as categorias principais.

Em relação aos IMEs, foram identificados 251 elementos distribuídos em 12 gêneros e 58 espécies diferentes (Figura 7 e Tabela S5). Entre as espécies analisadas, *Rhizobium leguminosarum* destacou-se por apresentar o maior número de IMEs (28), seguido por *Bradyrhizobium sp.* (37) e *Mesorhizobium sp.* (20). Esses resultados sugerem uma maior propensão desses gêneros para a aquisição e manutenção de elementos genéticos móveis, possivelmente relacionada a estratégias adaptativas e de diversificação genômica (Frost et al., 2005; Juhas et al., 2009).



**Figura 7. Distribuição do número de IMEs identificados em espécies da família *Rhizobiaceae*.** A figura apresenta um gráfico de barras horizontais, onde cada barra representa o número total de IMEs encontrados em cada espécie. As espécies estão organizadas verticalmente, com o número de IMEs indicado no eixo horizontal.

A presença e distribuição de IMEs nos genomas analisados reforçam a importância desses elementos na plasticidade genômica e na capacidade de adaptação bacteriana, seja para a aquisição de genes de resistência, tolerância a estresses ou interações com hospedeiros (Partridge et al., 2018). No entanto, a ausência de IMEs em alguns gêneros sugere que nem todas as linhagens dependem desses elementos para sua adaptação, indicando uma possível estabilidade genômica ou a utilização de outras estratégias evolutivas.



**Figura 8.** Comparação entre o tamanho médio das sequências de IMEs por gênero na família *Rhizobiaceae* e o tamanho dos cromossomos analisados. Escalas distintas.

A análise do tamanho médio (Figura 8) e da frequência média dos IMEs em cada gênero revelou variações tanto no número quanto no tamanho das sequências entre as diferentes espécies dentro da família *Rhizobiaceae*.

O número médio de IMEs por gênero variou, com uma média geral de aproximadamente 3,32 IMEs. Entre os gêneros investigados, *Bradyrhizobium* destacou-se com a maior número médio de IMEs, apresentando 6,21 IMEs por espécie, o que sugere uma grande diversidade de IMEs dentro desse gênero. Em contraste, gêneros como *Neorhizobium* e *Shinella* exibiram médias muito menores, com apenas 1,5 IMEs por espécie.

A análise do tamanho médio das sequências de IMEs revelou uma ampla variação, com valores que variaram de 5.943 pb a 88.197 pb, e uma média geral de aproximadamente 34.662 pb. Entre os gêneros analisados, *Pararhizobium* se destacou por

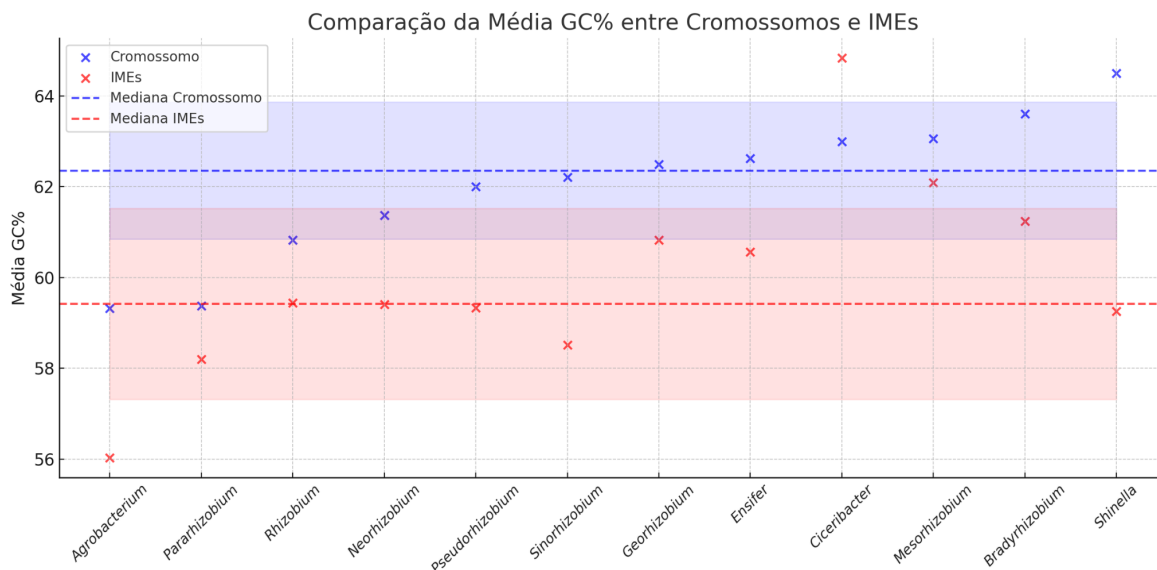
apresentar os maiores tamanhos médios de sequências (58.951,75 pb), valor que excede a média geral. Por outro lado, *Agrobacterium* apresentou os menores tamanhos médios, com 25.808 pb.

Essa variabilidade no número e tamanho dos IMEs pode estar relacionada às diferentes estratégias adaptativas e ecológicas dos gêneros analisados. Por exemplo, gêneros com maior número de IMEs, como *Rhizobium* (68) e *Bradyrhizobium* (87), podem ter uma maior capacidade de adquirir e mobilizar genes que conferem vantagens adaptativas, como resistência a antibióticos ou tolerância a estresses ambientais (Frost et al., 2005; Juhas et al., 2009). Por outro lado, a ausência ou baixa ocorrência de IMEs em alguns gêneros pode refletir uma menor dependência de elementos móveis para sua adaptação ou uma maior estabilidade genômica (Partridge et al., 2018).

Essas análises evidenciam que o gênero *Bradyrhizobium* possui uma grande diversidade de IMEs, enquanto o tamanho médio das sequências varia consideravelmente entre os gêneros.

Coincidentemente ou não, *Bradyrhizobium* é o gênero que apresenta o maior número de ICEs. Esse fato sugere a possibilidade de que a mobilização de IMEs possa ocorrer com maior frequência na presença de ICEs. No entanto, é importante destacar que essa hipótese, embora plausível com base nos resultados encontrados, não deve ser considerada uma conclusão definitiva neste estudo. A investigação dessa interação entre IMEs e ICEs demanda pesquisas adicionais, que possam confirmar ou refutar essa possível correlação.

A análise do conteúdo GC% dos IMEs entre diferentes gêneros bacterianos (Figura 9) revela uma ampla variação, com uma média geral de 59,97% e uma faixa que se estende de 56,02% a 64,84%. Essa variabilidade pode estar relacionada a diferentes pressões evolutivas e adaptações genômicas, (Rocha & Danchin, 2002; Bentley & Parkhill, 2004).



**Figura 9. Relação entre a média de GC% dos cromossomos e dos elementos integrativos mobilizáveis em gêneros de rizóbios.** Cada ponto azul representa a média de GC% do cromossomo de um gênero, enquanto os pontos vermelhos indicam a média de GC% dos IMEs correspondentes. A linha tracejada azul representa a mediana do GC% dos cromossomos, e a linha tracejada vermelha, a mediana do GC% dos IMEs. As áreas sombreadas indicam a variação dentro de um desvio padrão.

A comparação entre o conteúdo GC dos IMEs e o conteúdo GC do cromossomo bacteriano é fundamental para inferir processos de THG. IMEs com conteúdo GC semelhante ao do cromossomo hospedeiro podem indicar uma longa história de associação e coevolução, enquanto diferenças significativas sugerem aquisições recentes de elementos genéticos móveis (Juhás et al., 2009; Wozniak & Waldor, 2010). Por exemplo, o gênero *Mesorhizobium* é um dos gêneros que apresenta a média GC% mais alta entre os IMEs analisados (62,09%), o que pode refletir uma maior similaridade com o conteúdo GC% do cromossomo desse gênero, indicando uma possível estabilização desses elementos no genoma. Por outro lado, *Ciceribacter*, com um único IME analisado e o maior conteúdo GC% observado (64,84%), pode representar um caso de aquisição recente ou exógena, dada a possível discrepância com o conteúdo GC cromossômico.

A variação observada entre os gêneros, como a média GC em *Agrobacterium* (56,02%) e em *Bradyrhizobium* (61,24%), sugere diferentes histórias evolutivas e dinâmicas de THG. Esses resultados estão alinhados com a hipótese de que a integração e a manutenção de IMEs no genoma bacteriano são influenciadas pela compatibilidade genômica, incluindo o conteúdo GC (Lawrence & Ochman, 1998).

A análise global da localização desses elementos sugere que os IMEs na família *Rhizobiaceae* têm uma distribuição preferencial em regiões codificadoras de proteínas,

com variações significativas entre os gêneros, possivelmente refletindo diferenças na função e na regulação genética desses elementos.

Em relação a análise das regiões *OriT* os resultados revelam padrões distintos na distribuição e na quantidade desses elementos entre os diferentes gêneros e espécies estudadas. As regiões *OriT*, que são essenciais para a mobilização genética, variam significativamente em número e comprimento, refletindo diferenças na capacidade de transferência horizontal de genes. Entre os gêneros analisados, *Mesorhizobium* apresenta a maior diversidade em termos de regiões *OriT*, com um número considerável de intervalos identificados. Essa ampla variedade pode indicar uma alta frequência de eventos de transferência horizontal de genes dentro desse gênero, possivelmente contribuindo para sua adaptabilidade e complexidade genética. Em comparação, gêneros como *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium* também mostram uma presença significativa de regiões *OriT*, mas com uma distribuição que sugere padrões diferentes na mobilização genética.

As espécies dentro dos gêneros *Agrobacterium* e *Mesorhizobium* demonstram uma ampla variação na quantidade de IMEs, o que se reflete na diversidade das regiões *OriT* observadas. Por exemplo, algumas espécies desses gêneros apresentam múltiplas regiões *OriT*, indicando uma capacidade considerável para a transferência horizontal de genes. Em contraste, gêneros como *Shinella* e *Georhizobium* têm uma quantidade menor de regiões *OriT*, o que pode sugerir uma frequência mais baixa de eventos de transferência genética ou uma estratégia diferente de mobilização.

A análise dos dados obtidos para a presença de genes cargo em IMEs revelou uma diversidade de efeitos funcionais associados a esses genes nas bactérias da família *Rhizobiaceae*. Os resultados obtidos a partir do PlaBase mostram que muitos dos genes cargo desempenham papéis importantes tanto em efeitos diretos quanto indiretos relacionados a diversas funções celulares e de interação com o ambiente (Figura 10). Essa diversidade funcional é semelhante à observada em ICEs, onde genes cargo também estão associados a processos como exclusão competitiva, resistência a antimicrobianos, mobilidade genética e interações com plantas (Johnson & Grossman, 2015; Wozniak & Waldor, 2010). Essa semelhança sugere que IMEs e ICEs compartilham mecanismos evolutivos convergentes, nos quais a aquisição de genes cargo confere vantagens adaptativas às bactérias em ambientes desafiadores.



**Figura 10. Análise dos efeitos dos genes cargos nos IMEs da família *Rhizobiaceae*.** Gráfico A: Principais efeitos diretos nos IMEs encontrados em espécies da família *Rhizobiaceae*. Gráfico B: Principais efeitos indiretos. Cada efeito é representado por uma cor específica, de acordo com a categoria a qual pertence, conforme indicado na legenda da figura.

Os gráficos foram gerados utilizando ferramentas do Python e representam um resumo dos principais efeitos identificados nos IMEs analisados no software PlaBase.

Entre os genes com maior contagem, destaca-se o *BrnA\_antitoxin*, com sua presença sendo observada 27 vezes dentre as sequências analisadas. Este gene é associado a efeitos indiretos (Figura 10, B.), especificamente na exclusão competitiva, e está implicado em sistemas de toxinas-antitoxinas que contribuem para a adequação bacteriana em ambientes competitivos (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009). Outro gene com alta frequência é o *bpeT*, aparecendo 23 vezes, que também está envolvido em efeitos indiretos relacionados à exclusão competitiva, destacando-se na resistência a múltiplas drogas e transporte de cloranfenicol e trimetoprim, o que pode impactar a capacidade da bactéria de competir eficazmente em ambientes com pressão de antimicrobianos (Juhás et al., 2009). Além disso, genes como *cheW* e *cyb|gidA*, envolvidos em motilidade, quimiotaxia e formação de biofilmes, destacam a importância desses elementos na colonização de nichos ecológicos e na interação com plantas, um padrão também observado em ICEs (Compant et al., 2005). Genes como *mexL* (5) e *padA* (5), são envolvidos em resistência a múltiplas drogas e no uso de substratos derivados de plantas, respectivamente, destacando a importância de estratégias múltiplas de sobrevivência e adaptação ambiental.

No que diz respeito aos efeitos diretos, genes como *pepP*, *praC|xylH* e *yusV|ABC\_FEV\_A|feuD* estão associados à biodegradação de xenobióticos e à aquisição de nutrientes, como o ferro, processos que são essenciais para a promoção do crescimento vegetal. Esses genes têm paralelos em ICEs, que frequentemente carregam genes relacionados à fixação de nitrogênio e à produção de fitormônios, como o ácido indolacético (AIA), que atuam diretamente no desenvolvimento das plantas (Glick, 2012; Colombi et al., 2021).

Em conjunto, os resultados sugerem que os genes cargo dos IMEs desempenham funções semelhantes às observadas em ICEs, com ambos os elementos atuando como vetores de adaptação bacteriana. Essa convergência funcional reforça a importância dos elementos genéticos móveis na evolução bacteriana e na interação com plantas, destacando seu potencial biotecnológico para aplicações em agricultura sustentável. Os resultados obtidos para ICEs e IMEs destacam diferenças fundamentais em sua mobilidade. Os ICEs demonstram maior flexibilidade ao se integrarem em diferentes regiões do genoma,

enquanto os IMEs são mais restritos, frequentemente se inserindo em locais específicos, como tRNAs.

Em conclusão, os ICEs são elementos móveis autônomos com um papel mais abrangente na evolução dos rizóbios, fornecendo flexibilidade genética e adaptação a uma ampla gama de condições. Os IMEs, embora menos independentes, contribuem para a adaptação em nichos específicos.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Grupo de Genômica Eco-Evolutiva Microbiana (GGEM) e ao Laboratório de Genética Microbiana Molecular (LGMM) da Universidade Federal de Viçosa pela colaboração neste trabalho.

### **Informações sobre financiamento**

Esse estudo teve o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 130401/2022-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa de Excelência Acadêmica-Código Financeiro 001 (CAPES/PROEX - 23038.009464/2021-92), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)..

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### **Material suplementar**

Clique aqui para acessar o [PDF](#) .

(Link de acesso:  
<https://drive.google.com/file/d/1eITV5103UmkiDcGZ99o15zgClsCya458/view?usp=sharing> )

### **Conclusão**

A presente pesquisa abordou a importância dos ICEs e IMEs em bactérias rizobiais e proporcionou uma caracterização abrangente desses elementos em bactérias rizobiais, elucidando seus padrões de distribuição, características estruturais e relevância funcional para a adaptação bacteriana e seu potencial para futuramente melhorar a biotecnologia agrícola, com o foco voltado especialmente para a promoção do crescimento das plantas.

Os resultados revelaram uma ampla disseminação desses elementos entre os diferentes gêneros analisados, com marcantes variações em sua abundância e características genômicas.

Os ICEs demonstraram uma notável predominância no gênero *Bradyrhizobium*, que apresentou 173 elementos em 149 genomas, seguido por *Agrobacterium* e *Mesorhizobium*. Essa distribuição sugere diferentes estratégias evolutivas de aquisição e manutenção desses elementos entre os diversos grupos taxonômicos. A análise estrutural dos ICEs revelou uma considerável variação no tamanho (66-249 Kb) e conteúdo de GC, indicando desde elementos altamente móveis até aqueles mais estabilizados nos genomas hospedeiros.

Paralelamente, os IMEs mostraram um padrão distinto de distribuição, com 251 elementos identificados em 12 gêneros, destacando-se *Rhizobium leguminosarum* (28 IMEs) e *Bradyrhizobium sp.* (37 IMEs). A análise comparativa do conteúdo de GC entre IMEs e genomas hospedeiros sugeriu diferentes históricos evolutivos, desde aquisições recentes até associações genômicas mais antigas. Particularmente interessante foi a observação de que os gêneros com maior abundância de ICEs também tendiam a apresentar maior número de IMEs, levantando questões sobre possíveis interações sinérgicas entre esses elementos.

A caracterização funcional dos genes cargo associados a esses elementos móveis revelou um extenso repertório de características adaptativas, incluindo genes envolvidos em processos-chave como: biorremediação (*ddpA/ABC\_PE\_S*), nutrição vegetal (*ymfI/fabG/efpI*), resistência a estresses (*oxyR*) e interações planta-bactéria (*acd*).

A análise comparativa entre ICEs e IMEs destacou diferenças fundamentais em seus mecanismos de mobilização e padrões de inserção genômica. Enquanto os ICEs apresentaram maior flexibilidade de integração, os IMEs mostraram preferência por locais específicos, como genes de tRNA. Essa distinção reflete diferentes estratégias evolutivas de disseminação e estabilização genômica.

Os sistemas de conjugação associados aos ICEs revelaram notável conservação evolutiva, particularmente nos componentes do T4SS, contrastando com a variabilidade observada nas regiões oriT. Essa combinação de conservação estrutural e diversidade regulatória sugere um sofisticado equilíbrio entre eficiência de transferência e especificidade de hospedeiro.

Os achados desta pesquisa oferecem uma base sólida para futuras investigações sobre o papel dos ICEs na biotecnologia agrícola e na melhoria das práticas agrícolas sustentáveis, contribuindo para a segurança alimentar e o desenvolvimento sustentável.

Em síntese, este trabalho não apenas comprovou a hipótese inicial sobre a ampla distribuição e importância funcional dos ICEs e IMEs em rizóbios, mas também estabeleceu bases sólidas para pesquisas futuras. A compreensão detalhada desses elementos e seus mecanismos de ação representa um avanço significativo no campo da microbiologia agrícola, com potencial para transformar práticas de cultivo e contribuir para a segurança alimentar global.

### **Referências bibliográficas**

Assis, J. C. S. (2021). Elementos integrativos e conjugativos em bactérias fitopatogênicas de impacto econômico e científico [Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa]. Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: [<https://locus.ufv.br/items/a07f8068-1ea0-4b1b-9d93-5a08e8e9b063>]

Alvarez-Martinez CE, Christie PJ2009. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiol Mol Biol Rev*73: <https://doi.org/10.1128/mmlbr.00023-09>

Andrews, M., Meyer, S., Meyer, S., James, E., Stępkowski, T., Hodge, S., Simon, M., & Young, J. (2018). Horizontal Transfer of Symbiosis Genes within and Between Rhizobial Genera: Occurrence and Importance. *Genes*, 9. <https://doi.org/10.3390/genes9070321>.

Bean, E. L., Herman, C., Anderson, M. E., & Grossman, A. D. (2022). Biology and engineering of integrative and conjugative elements: Construction and analyses of hybrid ICEs reveal element functions that affect species-specific efficiencies. *PLOS Genetics*, 18(5), e1009998. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009998>

Bellanger, X., Guilloteau, H., Bonot, S., Merlin, C. (2014). Demonstrating plasmid-based horizontal gene transfer in complex environmental matrices: a practical approach for a critical review. *Sci Total Environ*, 493, 872-82. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.070

Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., & Guédon, G. (2014). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: Evolution and diversity. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 38, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>

Bi, D., Xu, Z., Harrison, E. M., Tai, C., Wei, Y., He, X., Jia, S., Deng, Z., Rajakumar, K., & Ou, H. Y. (2012). ICEberg: A web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria. *Nucleic Acids Research*, 40(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr846>

Bentley SD, Parkhill J. Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu Rev Genet.* 2004;38:771-92. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.094318. PMID: 15568993.

Botelho, J., & Schulenburg, H. (2021). The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. In *Trends in Microbiology* (Vol. 29, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.011>

Bruns, H., Crüsemann, M., Letzel, A., Alanjary, M., McInerney, J., Jensen, P., Schulz, S., Moore, B., & Ziemert, N. (2017). Function-related replacement of bacterial siderophore pathways. *The ISME Journal*, 12, 320 - 329. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.137>.

Burrus, V. (2017). Mechanisms of stabilization of integrative and conjugative elements. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 44-50. doi: 10.1016/j.mib.2017.03.014

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., & Guédon, G. (2002a). Conjugative transposons: The tip of the iceberg. In *Molecular Microbiology* (Vol. 46, Issue 3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03191.x>

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., & Guédon, G. (2002b). The ICES<sub>t1</sub> element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid*, 48(2). [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00102-6)

Burrus, V., & Waldor, M. K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. In *Research in Microbiology* (Vol. 155, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.012>

Carraro, N., & Burrus, V. (2015). The dualistic nature of integrative and conjugative elements. *Mobile Genetic Elements*, 5(2), 98-102. doi: 10.1080/2159256X.2015.1102796

Carraro, N., Poulin, D., & Burrus, V. (2015). Replication and Active Partition of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 Family: The Line between ICEs and Conjugative Plasmids Is Getting Thinner. *PLoS Genetics*, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005298>.

Colombi, E., Perry, B. J., Sullivan, J. T., Bekuma, A. A., Terpolilli, J. J., Ronson, C. W., & Ramsay, J. P. (2021). Comparative analysis of integrative and conjugative mobile genetic elements in the genus mesorhizobium. *Microbial Genomics*, 7(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000657>

Colombi E, Straub C, Künzel S, Templeton MD, McCann HC, Rainey PB. Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids. *Environ Microbiol*. 2017 Feb;19(2):819-832. doi: 10.1111/1462-2920.13662. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28063194.

COMPANT, Stéphane; CLÉMENT, Christophe; SESSITSCH, Angela. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Sep;71(9):4951-9. doi: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005. PMID: 16151072; PMCID: PMC1214602.

Crits-Christoph, A., Bhattacharya, N., Olm, M., Song, Y., & Banfield, J. (2020). Transporter genes in biosynthetic gene clusters predict metabolite characteristics and siderophore activity.. *Genome research*. <https://doi.org/10.1101/gr.268169.120>.

Croucher, N. J., Coupland, P. G., Stevenson, A. E., Callendrello, A., Bentley, S. D., & Hanage, W. P. (2014). Diversification of bacterial genome content through distinct mechanisms over different timescales. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6471>

Cury, J., Abby, S. S., Doppelt-Azeroual, O., Néron, B., & Rocha, E. P. C. (2020). Identifying Conjugative Plasmids and Integrative Conjugative Elements with CONJscan. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2075). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_19)

Cury, J., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2017). Integrative and conjugative elements and their hosts: composition, distribution and organization. *Nucleic Acids Research*, 45(15). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx607>

da Silva, G. C., Gonçalves, O. S., Rosa, J. N., França, K. C., Bossé, J. T., Santana, M. F., Langford, P. R., & Bazzolli, D. M. S. (2022). Mobile Genetic Elements Drive Antimicrobial Resistance Gene Spread in Pasteurellaceae Species. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773284>

de Assis, J. C. S., Gonçalves, O. S., Fernandes, A. S., de Queiroz, M. V., Bazzolli, D. M. S., & Santana, M. F. (2022). Genomic analysis reveals the role of integrative and conjugative elements in plant pathogenic bacteria. *Mobile DNA*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13100-022-00275-1>

Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N., & van der Meer, J. R. (2017). The hidden life of integrative and conjugative elements. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 4). <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX008>

EMBRAPA. Soja em números (safra 2024/2025): dados econômicos e área cultivada. Brasília: Embrapa Soja, 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 26 jun. 2025.

EMBRAPA SOJA. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Circular Técnica, n. 212, Londrina, PR, nov. 2024. 15 p. Disponível em: Infoteca CNPq/Embrapa. Acesso em: 1 jul. 2025.

Flynn, KJ, Swanson MS. (2014). Integrative Conjugative Element ICE- $\beta$ ox Confers Oxidative Stress Resistance to *Legionella pneumophila* In Vitro and in Macrophages. *mBio*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.01091-14>

François Delavat, Ryo Miyazaki, Nicolas Carraro, Nicolas Pradervand, Jan Roelof van der Meer, The hidden life of integrative and conjugative elements, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 41, Issue 4, July 2017, Pages 512–537, <https://doi.org/10.1093/femsre/fux008>

Franke, A. E., & Clewell, D. B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid. *Journal of Bacteriology*, 145(1). <https://doi.org/10.1128/jb.145.1.494-502.1981>

Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732. DOI: 10.1038/nrmicro1235

Fujihara, H., Hirose, J., & Suenaga, H. (2023). Evolution of genetic architecture and gene regulation in biphenyl/PCB-degrading bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1168246>.

Gaillard, M., Pradervand, N., Minoia, M., Sentchilo, V., Johnson, D., & Meer, J. (2010). Transcriptome analysis of the mobile genome ICE<sub>clc</sub> in *Pseudomonas knackmussii* B13. *BMC Microbiology*, 10, 153 - 153. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-153>.

Gao, Y., Zhong, Z., Sun, K., Wang, H., & Zhu, J. (2006). The quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium huakuii* affects growth rate and symbiotic nodulation. *Plant and Soil*, 286, 53-60. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9025-3>.

Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev*, 33(3), 657-87. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x

Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:963401. doi: 10.6064/2012/963401. Epub 2012 Sep 19. PMID: 24278762; PMCID: PMC3820493.

Gonçalves, O. S., Campos, K. F., de Assis, J. C. S., Fernandes, A. S., Souza, T. S., Rodrigues, L. G. D. C., de Queiroz, M. V., & Santana, M. F. (2020). Transposable elements contribute to the genome plasticity of *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microbial Genomics*, 6(5). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000374>

Gonçalves, O. S., de Assis, J. C. S., & Santana, M. F. (2022). Breaking the ICE: an easy workflow for identifying and analyzing integrative and conjugative elements in bacterial genomes. In *Functional and Integrative Genomics* (Vol. 22, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s10142-022-00903-2>

Gonçalves, O. S., de Queiroz, M. V., & Santana, M. F. (2020). Potential evolutionary impact of integrative and conjugative elements (ICEs) and genomic islands in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69490-1>

Gonçalves, O. S., & Santana, M. F. (2021). The coexistence of monopartite integrative and conjugative elements in the genomes of Acidobacteria. *Gene*, 777. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145476>

Gonçalves, O. S., Souza, F. de O., Bruckner, F. P., Santana, M. F., & Alfenas-Zerbini, P. (2021). Widespread distribution of prophages signaling the potential for adaptability and

pathogenicity evolution of *Ralstonia solanacearum* species complex. *Genomics*, 113(3).  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.02.011>

Gonçalves, O. S., Souza, T. S., Gonçalves, G. de C., Fernandes, A. S., Veloso, T. G. R., Tupy, S. M., Garcia, E. A., & Santana, M. F. (2023). Harnessing Novel Soil Bacteria for Beneficial Interactions with Soybean. *Microorganisms*, 11(2).  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11020300>

Grohmann, E., Christie, P. J., Waksman, G., & Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. In *Molecular Microbiology* (Vol. 107, Issue 4).  
<https://doi.org/10.1111/mmi.13896>

Guérillot R, Da Cunha V, Sauvage E, Bouchier C, Glaser P. 2013. Modular Evolution of TnGBSs, a New Family of Integrative and Conjugative Elements Associating Insertion Sequence Transposition, Plasmid Replication, and Conjugation for Their Spreading. *J Bacteriol* 195: <https://doi.org/10.1128/jb.01745-12>

Guglielmini J, Quintais L, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet*. 2011 Aug;7(8):e1002222. doi: 10.1371/journal.pgen.1002222. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21876676; PMCID: PMC3158045.

Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep*. 2001 May;2(5):376-81. doi: 10.1093/embo-reports/kve097. PMID: 11375927; PMCID: PMC1083891.

Hall, J. P., Brockhurst, M. A., & Harrison, E. (2017). Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1735), 20160424.

Haryono, Mindia, et al. "Differentiations in Gene Content and Expression Response to Virulence Induction between Two *Agrobacterium* Strains." *Frontiers in Microbiology*, vol.

10, 9 July 2019, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629968/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629968/),  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01554>.

Haskett, T. L., Ramsay, J. P., Bekuma, A. A., Sullivan, J. T., O'Hara, G. W., & Terpolilli, J. J. (2017). Evolutionary persistence of tripartite integrative and conjugative elements. In *Plasmid* (Vol. 92). <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.06.001>

Hirose, J. (2023). Diversity and Evolution of Integrative and Conjugative Elements Involved in Bacterial Aromatic Compound Degradation and Their Utility in Environmental Remediation. *Microorganisms*, 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020438>.

Hughes-Games A, Roberts AP, Davis SA, Hill DJ. Identification of integrative and conjugative elements in pathogenic and commensal Neisseriaceae species via genomic distributions of DNA uptake sequence dialects. *Microb Genom*. 2020 May;6(5):e000372. doi: 10.1099/mgen.0.000372. Epub 2020 May 4. PMID: 32375974; PMCID: PMC7371117

Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:755-76. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055. PMID: 18173371; PMCID: PMC3057177.

Jain R, Rivera MC, Lake JA. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3801-6. doi: 10.1073/pnas.96.7.3801. PMID: 10097118; PMCID: PMC22375.

Jiao, Jian, et al. "Coordinated Regulation of Core and Accessory Genes in the Multipartite Genome of *Sinorhizobium Fredii*." *PLOS Genetics*, vol. 14, no. 5, 24 May 2018, p. e1007428, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007428>.

Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*, 49. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>

Jolánkai, M., Birkás, M., Tarnawa, Á., Kassai, K.M. (2019). Agriculture and Climate Change. In: Palocz-Andresen, M., Szalay, D., Gosztom, A., Sípos, L., Taligás, T. (eds) International Climate Protection. Springer, Cham.

[https://doi.org/10.1007/978-3-030-03816-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-03816-8_10)

Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol Rev. 2009 Mar;33(2):376-93. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x. Epub 2008 Oct 29. PMID: 19178566; PMCID: PMC2704930.

Julien Guglielmini, Fernando de la Cruz, Eduardo P.C. Rocha, Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems, Molecular Biology and Evolution, Volume 30, Issue 2, February 2013, Pages 315–331, <https://doi.org/10.1093/molbev/mss221>

Kai Blin, Simon Shaw, Hannah E Augustijn, Zachary L Reitz, Friederike Biermann, Mohammad Alanjary, Artem Fetter, Barbara R Terlouw, William W Metcalf, Eric J N Helfrich, Gilles P van Wezel, Marnix H Medema, Tilmann Weber, antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation, Nucleic Acids Research, Volume 51, Issue W1, 5 July 2023, Pages W46–W50, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>

Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C. et al. Genome sequence of the Lotus spp. microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Stand in Genomic Sci* 9, 6 (2014). <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-6>

Kuzmanović, N., Fagorzi, C., Mengoni, A., Lassalle, F., & diCenzo, G. C. (2020). Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 3411-3418. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005243>

Kwon, S. W., Park, J. Y., Kim, J. S., Kang, J. W., Cho, Y. H., Lim, C. K., Parker, M. A., & Lee, G. B. (2005). Phylogenetic analysis of the genera Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium and Sinorhizobium on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed

spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 263-270. doi: 10.1099/IJS.0.63097-0

Lang, S., Gruber, K., Mihajlovic, S., Arnold, R., Gruber, C., Steinlechner, S., Jehl, M., Rattei, T., Fröhlich, K., & Zechner, E. (2010). Molecular recognition determinants for type IV secretion of diverse families of conjugative relaxases. *Molecular Microbiology*, 78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07423.x>.

Laguerre, G., Nour, S., Macheret, V., Sanjuán, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147(4), 981-993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>

Lawrence JG, Ochman H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9413-7. doi: 10.1073/pnas.95.16.9413. PMID: 9689094; PMCID: PMC21352.

LEDERBERG, J., TATUM, E. Gene Recombination in *Escherichia Coli*. *Nature* 158, 558 (1946). <https://doi.org/10.1038/158558a0>

Li, M., Chen, Q., Wu, C., Li, Y., Wang, S., Chen, X., Qiu, B., Li, Y., Mao, D., Lin, H., Yu, D., Cao, Y., Huang, Z., Cui, C., & Zhong, Z. (2022). A Novel Module Promotes Horizontal Gene Transfer in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Genes*, 13. <https://doi.org/10.3390/genes13101895>.

Li, M., Li, Y., Chen, W. F., Sui, X. H., Li, Y., Li, Y., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2012). Genetic diversity, community structure and distribution of rhizobia in the root nodules of *Caragana* spp. from arid and semi-arid alkaline deserts, in the north of China. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(4), 239-245. doi: 10.1016/j.syapm.2012.02.004

Li, X., Xie, Y., Liu, M., Tai, C., Sun, J., Deng, Z., & Ou, H. Y. (2018). OriTfinder: A web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial

mobile genetic elements. *Nucleic Acids Research*, 46(W1).  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky352>

Li, X., Du, Y., Du, P., Dai, H., Fang, Y., Li, Z., Lv, N., Zhu, B., Kan, B., & Wang, D. (2016). SXT/R391 integrative and conjugative elements in *Proteus* species reveal abundant genetic diversity and multidrug resistance. *Scientific Reports*, 6.  
<https://doi.org/10.1038/srep37372>.

Ling, J., Wang, H., Wu, P., Li, T., Tang, Y., Naseer, N., Zheng, H., Masson-Boivin, C., Zhong, Z., & Zhu, J. (2016). Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 13875 - 13880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615121113>.

Liu, M., Li, X., Xie, Y., Bi, D., Sun, J., Li, J., Tai, C., Deng, Z., & Ou, H. Y. (2019). ICEberg 2.0: An updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Research*, 47(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gky1123>

Liu, M., Liu, J., Liu, G., Wang, H., Wang, X., Deng, Z., He, Y., & Ou, H. Y. (2022). ICEO, a biological ontology for representing and analyzing bacterial integrative and conjugative elements. *Scientific Data*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-021-01112-5>

Maja, M.M., & Ayano, S.F. (2021). The Impact of Population Growth on Natural Resources and Farmers' Capacity to Adapt to Climate Change in Low-Income Countries. *Earth Systems and Environment*, 5, 271 - 283. DOI:10.1007/s41748-021-00209-6

Maheshwari, M., Abulreesh, H., Khan, M., Ahmad, I., & Pichtel, J. (2017). Horizontal Gene Transfer in Soil and the Rhizosphere: Impact on Ecological Fitness of Bacteria. , 111-130. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5589-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5589-8_6).

Malhi GS, Kaur M, Kaushik P. Impact of Climate Change on Agriculture and Its Mitigation Strategies: A Review. *Sustainability*. 2021; 13(3):1318.  
<https://doi.org/10.3390/su13031318>

Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>

Meng Liu, Xiaobin Li, Yingzhou Xie, Dexi Bi, Jingyong Sun, Jun Li, Cui Tai, Zixin Deng, Hong-Yu Ou, ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, Pages D660–D665, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1123>

Mousavi, S., Willems, A., Nesme, X., Lajudie, P., & Lindström, K. (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(2), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). [S. l.], 2025. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 26 jun. 2025.

Néron, B., Denise, R., Coluzzi, C., Touchon, M., Rocha, E. P. C., & Abby, S. S. (2023). MacSyFinder v2: Improved modelling and search engine to identify molecular systems in genomes. *Peer Community Journal*, 3. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.250>

Obi, C. C., et al. (2018). The Integrative Conjugative Element *clc* (ICE*clc*) of *Pseudomonas aeruginosa* JB2. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01532>

Oliveira, P., Prather, K., Prazeres, D., & Monteiro, G. (2010). Analysis of DNA repeats in bacterial plasmids reveals the potential for recurrent instability events. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 2157-2167. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2671-7>.

Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L. E., Rogel, M. A., González, V., Peralta, H., Mora, J., Martínez-Romero, J., & Martínez-Romero, E. (2014). Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(1), 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.002>

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., & Cheng, Y. (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>

Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Aug 1;31(4):e00088-17. doi: 10.1128/CMR.00088-17. PMID: 30068738; PMCID: PMC6148190.

Patz, S., Gautam, A., Becker, M., Ruppel, S., Rodríguez-Palenzuela, P., & Huson, DH. (2021). PLaBAsE: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of plant-associated bacteria. *BioRxiv*, 3.

Pérez-Montaña, F., et al. (2014). The Symbiotic Biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, Necessary for Successful Colonization and Symbiosis. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0105901

Ramsay, J., Sullivan, J., Jambari, N., Ortori, C., Heeb, S., Williams, P., Barrett, D., Lamont, I., & Ronson, C. (2009). A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Molecular Microbiology*, 73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06843.x>

Ramsay, J., Major, A., Komarovskiy, V., Sullivan, J., Dy, R., Hynes, M., Salmond, G., & Ronson, C. (2013). A widely conserved molecular switch controls quorum sensing and symbiosis island transfer in *Mesorhizobium loti* through expression of a novel antiactivator. *Molecular Microbiology*, 87. <https://doi.org/10.1111/mmi.12079>

Ramsay, J., Tester, L., Major, A., Sullivan, J., Edgar, C., Kleffmann, T., Patterson-House, J., Hall, D., Tate, W., Hynes, M., & Ronson, C. (2015). Ribosomal frameshifting and dual-target antiactivation restrict quorum-sensing-activated transfer of a mobile genetic element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 4104 - 4109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501574112>.

Ramsay JP, Kwong SM, Murphy RJ, Yui Eto K, Price KJ, Nguyen QT, O'Brien FG, Grubb WB, Coombs GW, Firth N. An updated view of plasmid conjugation and mobilization in *Staphylococcus*. *Mob Genet Elements*. 2016 Jul 1;6(4):e1208317. doi: 10.1080/2159256X.2016.1208317. PMID: 27583185; PMCID: PMC4993578.

Remigi, P., Zhu, J., Young, J. P. W., & Masson-Boivin, C. (2016). Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology*, 24(1), 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>

Rocha EP, Danchin A. Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet*. 2002 Jun;18(6):291-4. doi: 10.1016/S0168-9525(02)02690-2. PMID: 12044357.

Roberts, A. P., & Mullany, P. (2009). A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. In *Trends in Microbiology* (Vol. 17, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.03.002>

Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C., ... & Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen Fixation in Cereals. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>

Ryan, M., Carraro, N., Slattery, S., & Pembroke, J. (2023). Integrative Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 family drive adaptation and evolution in  $\gamma$ -Proteobacteria.. *Critical reviews in microbiology*, 1-22 . <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2161870>.

Ryan, M. P., Armshaw, P., & Pembroke, J. T. (2016). SXT/R391 integrative and conjugative elements (ICEs) encode a novel ‘trap-door’ strategy for mobile element escape. *Frontiers in Microbiology*, 7, 829. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00829>

Santos R, Hérouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-Sinorhizobium meliloti symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001 Jan;14(1):86-9. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.1.86. PMID: 11194876.

S. Patz, A. Gautam, M. Becker, S. Ruppel, P. Rodríguez-Palenzuela, DH. Huson. PLaBAs: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of plant-associated bacteria. *bioRxiv* 2021 <https://doi.org/10.1101/2021.12.13.472471>

Sharon, I., Birkland, A., Chang, K. Y., El-Yaniv, R., & Yona, G. (2005). Correcting BLAST e-Values for Low-Complexity Segments. *Journal of Computational Biology*, 12(7), 980-1003.

Smillie CGarcillán-Barcia MPFrancia MV, Rocha EPC, de la Cruz F2010.Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*74:.<https://doi.org/10.1128/mmbr.00020-10>

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*. 2007 Jul;31(4):425-48. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x. Epub 2007 May 17. PMID: 17509086.

Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B., & Ronson, C. W. (1995). Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8985–8989. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8985>

Sullivan, J., Trzebiatowski, J., Cruickshank, R., Gouzy, J., Brown, S., Elliot, R., Fleetwood, D., McCallum, N., Rossbach, U., Stuart, G., Weaver, J., Webby, R., Bruijn, F., & Ronson, C. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of

Mesorhizobium loti strain R7A. *Journal of Bacteriology*, 184, 3086–3095.  
<https://doi.org/10.1128/JB.184.11.3086-3095.2002>

Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 35, Issue 5).  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x>

Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006 Jun;70(2):296-316. doi: 10.1128/MMBR.00048-05. PMID: 16760305; PMCID: PMC1489542.

Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M., & Minamisawa, K. (2004). Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome. *Journal of Bacteriology*, 186, 2439 - 2448. <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2439-2448.2004>.

van der Meer, J. R., & Sentchilo, V. (2003). Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 14, Issue 3).  
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00058-2)

Van Melderren, L., & Saavedra De Bast, M. (2009). Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLoS Genetics*, 5(3), e1000437.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000437>

Wang, M., Liu, G., Liu, M., Tai, C., Deng, Z., Song, J., & Ou, H. Y. (2024). ICEberg 3.0: functional categorization and analysis of the integrative and conjugative elements in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 52(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkad935>

Wardell, G., Hynes, M., Young, P., & Harrison, E. (2021). Why are rhizobial symbiosis genes mobile?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 377. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0471>.

Weisberg, A. J., & Chang, J. H. (2023). Mobile Genetic Element Flexibility as an Underlying Principle to Bacterial Evolution. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 77). <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032521-022006>

Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>

Xiaobin Li, Yingzhou Xie, Meng Liu, Cui Tai, Jingyong Sun, Zixin Deng, Hong-Yu Ou, oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue W1, 2 July 2018, Pages W229–W234, <https://doi.org/10.1093/nar/gky352>

Yang, L., Jiang, Z., Li, Y., Wang, E., & Zhi, X. (2020). Plasmids Related to the Symbiotic Nitrogen Fixation Are Not Only Cooperated Functionally but Also May Have Evolved over a Time Span in Family Rhizobiaceae. *Genome Biology and Evolution*, 12, 2002 - 2014. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa152>.

Zahran, H. H. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 4, p. 968–989, 1999.

Zhang, Y. J., Wang, E. T., Tian, C. F., Wang, F. Q., Han, L. L., Chen, W. X., & Chen, W. F. (2008). *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiology Letters*, 285(2), 146-154. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01169.x

Zheng, Q., Li, L., Yin, X., Che, Y., & Zhang, T. (2023). Is ICE hot? A genomic comparative study reveals integrative and conjugative elements as “hot” vectors for the dissemination of antibiotic resistance genes. *MSystems*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00178-23>

Zhu, Jie, et al. “Effects of Rehydration on Physiological and Transcriptional Responses of a Water-Stressed Rhizobium.” *The Journal of Microbiology*, vol. 60, no. 1, 26 Nov. 2021, pp. 31–46, <https://doi.org/10.1007/s12275-022-1325-7>.