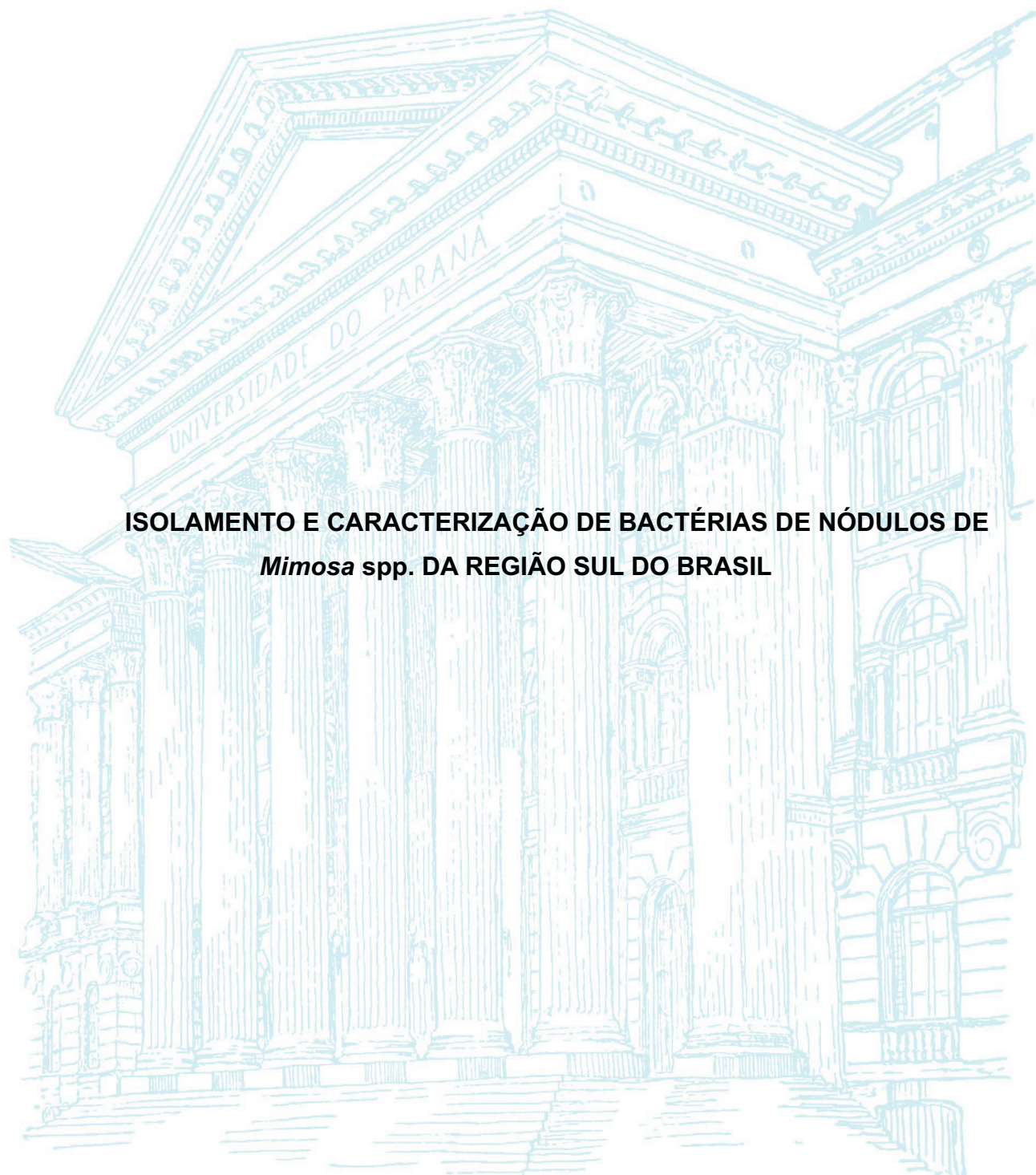


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEILANE CALINE SILVA



**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE
Mimosa spp. DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

CURITIBA

2018

LEILANE CALINE SILVA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE
Mimosa spp. DA REGIÃO SUL DO BRASIL

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências (Bioquímica), no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz
Coorientador: Dr. Daniel Renato Lammel

CURITIBA

2018



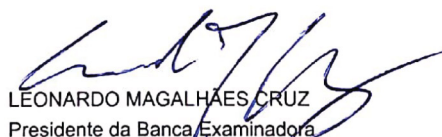
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LEILANE CALINE SILVA** intitulada: **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE *Mimosa* spp. DA REGIÃO SUL DO BRASIL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Junho de 2018.



LÉONARDO MAGALHÃES CRUZ
Presidente da Banca Examinadora



ROSELI WASSEM
Avaliador Externo



GLACIELA KASCHUK
Avaliador Externo



LUC FELICIANUS MARIE ROUWS
Avaliador Externo



EMANUEL MALTEMPÍ DE SOUZA
Avaliador Interno

Dedico este trabalho aos que,
verdadeiramente, se preocuparam e me
ajudaram a finalizar este trabalho e conquistar
este título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz, e meu coorientador Dr. Daniel Renato Lammel, por designarem esta pesquisa a mim e pelo trabalho nestes 4 anos de Doutorado.

Ao Dr. Euan K. James, por acreditar na minha capacidade e confiar este projeto a mim.

À minha banca interna, Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro e Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, por acompanharem meu trabalho, pelos conselhos e sugestões. E à banca examinadora, por avaliar meu trabalho no dia da defesa.

À Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), pela oportunidade de cursar o Doutorado. Ao secretário Thiago, sempre disponível nas dúvidas administrativas.

A todos os órgãos de fomento, em especial ao CNPq pela bolsa de estudos concedida a mim durante o curso, mas também todas as outras que financiam nosso laboratório, e que tornaram possível a realização do trabalho.

Aos técnicos envolvidos no laboratório (Valter, Eduardo, Roseli Prado e Bruna), por estarem sempre disponíveis em ajudar no que era preciso. E aos técnicos do Herbário Municipal do Jardim Botânico de Curitiba, por auxiliarem em todas as coletas e identificações das plantas coletadas.

À minha família, meus pais e irmãos, por me darem todo suporte, por me fazerem chegar onde cheguei e onde vou chegar, por acreditarem em mim e me moldarem como sou hoje, determinada, que corre atrás do que é preciso, sem medo de encarar as dificuldades.

Ao Alexandre, meu marido, por todo suporte e por toda a força que achou dentro de mim, por me ajudar em cada momento de dificuldade, por escutar meus lamentos, enxugar minhas lágrimas e me chamar a atenção nos momentos de fraqueza, me aconselhar e não me deixar desistir, por me distrair em cada momento

de stress, por ficar deitado no chão ao meu lado me ajudando a finalizar. Esta tese também é dele, sem ele não teria terminado.

Aos meus amigos do laboratório (Caroline, Rocío, Vanessa, Fernanda, Heloísa, Edileusa, Ana, Gillise, Thiago, Alysson, Marcelo, Adrian, Maritza), pelos desabafos, choros, risadas e camaradagens no laboratório. Em especial, ao Steve e à Fernanda Sabadin, por também me darem apoio na bancada, troca de ideias, e por continuarem o trabalho.

Aos meus amigos externos ao laboratório (Mariana, Elisana, Paulo, Gabriela, Rodrigo e Eliane) pelas conversas e momentos especiais na minha vida. À minha sogra, Patrícia, pelas correções da tese e conselhos para fechar o trabalho o mais impecável possível. À minha psicóloga, Bárbara, que ainda me ajuda a passar por tudo isto organizando minhas ideias.

E no meio de um inverno, eu finalmente aprendi
que havia, dentro de mim, um verão invencível.

Albert Camus

RESUMO

A América do Sul é, possivelmente, o centro de origem do gênero *Mimosa* com grande ocorrência de espécies endêmicas, devido a sua localização geográfica, variações de terreno e composição do solo. Alguns gêneros de bactérias, conhecidas como rizóbios, colonizam as raízes de *Mimosa* spp., induzindo a formação de nódulos, onde permanecem alojadas e contribuem para o desenvolvimento da planta através da fixação biológica de nitrogênio. Os rizóbios capazes de nodular plantas do gênero *Mimosa* pertencem às classes Alfaproteobacteria e Betaproteobacteria, sendo denominadas de alfa-rizóbios e beta-rizóbios, respectivamente. Na zona Tropical, são isoladas, mais frequentemente, beta-rizóbios do gênero *Paraburkholderia*, enquanto em zona Subtropical (ex., Uruguai), predomina *Cupriavidus*. O objetivo deste trabalho foi coletar *Mimosa* spp. em regiões do Leste do Paraná e Santa Catarina, no Sul do Brasil, e caracterizar as bactérias isoladas dos nódulos, verificando se há uma possível transição de gêneros em relação à latitude terrestre em direção ao Uruguai. Os isolados adquiridos foram identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e por espectrometria de massa MALDI-TOF, observando-se predominância de beta-rizóbios do gênero *Paraburkholderia*. Em uma única amostra foi identificado o gênero *Cupriavidus*. Em menor número, foram identificados alfa-rizóbios do gênero *Rhizobium* e, também, bactérias associativas, não capazes de induzir a formação de nódulos, como os gêneros *Pseudomonas* e *Herbaspirillum*. A caracterização de isolados dos gêneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Rhizobium*, abaixo do nível de gênero, foi obtida por análises BOX-PCR e sequenciamento genômico. Estes isolados foram também re-inoculados em plantas de *Mimosa pudica* (usada como isca), em condições de casa de vegetação, confirmando sua capacidade nodulante. A montagem parcial das sequências genômicas e sua análise confirmou a presença de genes envolvidos na nodulação e fixação biológica de nitrogênio em alguns dos isolados, e permitiu a confirmação das espécies *Cupriavidus necator* (1 isolado), *Paraburkholderia mimosarum* (1 isolado) e *Paraburkholderia caribensis* (2 isolados). Os demais isolados, para os quais foi realizado o sequenciamento genômico, mostraram potencial para constituírem novas espécies de *Paraburkholderia* sp. (3 isolados), *Rhizobium* sp. (1 isolado) e *Herbaspirillum* sp. (1 isolado).

Palavras-chave: *Mimosa*, beta-rizóbios, *Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, alfa-rizóbios, BOX-PCR, MALDI-TOF MS, genômica.

ABSTRACT

South America is, probably, the center of origin of *Mimosa* genus, within great occurrence of endemic species, due to their geographic location, grounds variation and soil composition. Some bacteria genera, known as rhizobia, colonize *Mimosa* spp. roots, inducing generation of nodules, where they remain lodged and contribute to the plant development by biological nitrogen fixation. Rhizobia that are able to nodulate *Mimosa* genera plants belong to Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria classes, and have been denominated alpha-rhizobia and beta-rhizobia, respectively. In the Tropical zone, it is isolated, more often, beta-rhizobia from *Paraburkholderia* genus, while in Subtropical zone (for example, Uruguay), predominates *Cupriavidus*. The main objective of this work was to collect *Mimosa* spp. in regions of East of Paraná and Santa Catarina states, South of Brazil, and to characterize bacteria isolated from nodules, checking if there were a possible transition between genera according to terrestrial latitude towards Uruguay. The acquired isolates were identified by partial gene 16S rRNA sequencing and for MALDI-TOF mass spectrometry, observing predominance of beta-rhizobia from *Paraburkholderia* genus. In only one sample was identified *Cupriavidus* genus. In less amount, alpha-rhizobia were identified alpha-rhizobia of *Rhizobium* genus and associative bacteria, not able to induce nodule generation, as *Pseudomonas* and *Herbaspirillum*. The characterization under genus level of *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* and *Rhizobium* genera were obtained by BOX-PCR analysis and genomic sequencing. These isolates were reinoculated in *Mimosa pudica* plantules (used as decoy), in vegetation house conditions, confirming their nodulating capability. The partial assembly of the genomic sequences and their analysis confirmed the presence of genes involved in the nodulation and biological nitrogen fixation in some of the isolates, and allowed to confirm species of *Cupriavidus necator* (1 isolate), *Paraburkholderia mimosarum* (1 isolate) and *Paraburkholderia caribensis* (2 isolates). The other isolates, for which genomic sequencing was carried out, showed the potential to constitute new species of *Paraburkholderia* sp. (3 isolates), *Rhizobium* sp. (1 isolate) e *Herbaspirillum* sp. (1 isolate).

Keywords: *Mimosa*, beta-rhizobia, *Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, alpha-rhizobia, BOX-PCR, MALDI-TOF MS, genomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Biomassas do Brasil	17
Figura 2 -	Distribuição regional da vegetação natural	18
Figura 3 -	Distribuição geográfica do gênero <i>Mimosa</i>	19
Figura 4 -	Sinalização molecular entre rizóbio e leguminosa	21
Figura 5 -	Mecanismo de infecção do rizóbio na raiz de leguminosa	22
Figura 6 -	Distribuição taxonômica dos organismos com capacidade nodulatória entre o grupo das Proteobactérias	24
Figura 7 -	Pontos de coleta de espécimes de <i>Mimosa</i> no leste do estado do Paraná e nordeste de Santa Catarina	33
Figura 8 -	Número de espécies identificadas em cada gênero, e suas respectivas classes, através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	48
Figura 9 -	Distribuição relativa de gêneros de isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. no Sul do Brasil relativo às áreas de coleta	49
Figura 10 -	Árvore filogenética de isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. no Sul do Brasil, baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA dos isolados identificados	54
Figura 11 -	Padrões de amplificação de regiões de repetição BOX de isolados selecionados	56
Figura 12 -	Ensaio preliminar de nodulação em <i>Mimosa pudica</i> inoculada com isolados de <i>Mimosa</i> spp. do estado do Paraná	59
Figura 13 -	Vasos com plântulas de <i>Mimosa pudica</i> inoculadas com isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. do estado do Paraná	60
Figura 14 -	Ensaio de nodulação em <i>Mimosa pudica</i> para isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. do Sul do Brasil	63
Figura 15 -	Dendrograma gerado a partir de espectros de massa MALDI-TOF de células inteiras entre isolados identificados X isolados não identificados de SC	67
Figura 16 -	Dendrograma gerado a partir de espectros de massa MALDI-TOF obtidos de isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp., coletados no estado do Paraná	70
Figura 17 -	Total de genes de cada genoma	73

Figura 18 - Matriz de identidade para comparação todos contra todos os isolados entre genomas de isolados do gênero <i>Paraburkholderia</i> ...	77
Figura 19 - Árvore filogenética de MSLA dos genes 16S rRNA e <i>recA</i>	81
Figura 20 - Árvore filogenética do gene <i>nifH</i> dos isolados de <i>Mimosa</i> spp.	83
Figura 21 - Árvore filogenética do gene <i>nodC</i> dos isolados de <i>Mimosa</i> spp.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos de coleta e identificação de espécimes de <i>Mimosa</i> spp. nos estados do Paraná (PR) e Santa Catarina (SC)	34
Tabela 2 - Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados	38
Tabela 3 - Relação de bactérias isoladas de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. da região Sul do Brasil por sítios de amostragem	44
Tabela 4 - Identificação aproximada das espécies de isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. da região Sul do Brasil a partir de sequências parciais do gene 16S rRNA	51
Tabela 5 - Grupos genotípicos BOX-PCR para isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. do Sul do Brasil	57
Tabela 6 - Ensaio de nodulação em <i>Mimosa pudica</i> com os isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. no Sul do Brasil	62
Tabela 7 - Montagem e anotação das sequências genômicas de isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. do Sul do Brasil	75
Tabela 8 - GGDC entre <i>Paraburkholderia</i> spp. isoladas de nódulos de raízes de <i>Mimosa</i> spp. no estado do Paraná e espécies relacionadas	76
Tabela 9 - GGDC entre o isolado AA00356 de nódulos de raízes de <i>Mimosa</i> sp. no estado do Paraná e estirpes de <i>Cupriavidus</i> relacionadas	78
Tabela 10 - GGDC entre o isolado AA00380 de nódulos de raízes de <i>Mimosa</i> sp. no estado do Paraná e estirpes de <i>Rhizobium</i> relacionadas	80
Tabela 11 - GGDC entre o isolado AA00360 de nódulos de raízes de <i>Mimosa</i> sp. no estado do Paraná e estirpes de <i>Herbaspirillum</i> relacionadas ..	80

LISTA DE SIGLAS

sp	- Espécie
spp	- Espécies
N ₂	- Nitrogênio gasoso
FOD	- Floresta Ombrófila Densa
FOM	- Floresta Ombrófila Mista
FES	- Floresta Estacional Semidecidual
O ₂	- Oxigênio
NF	- Fatores Nod
LQO	- lipoquitooligossacarídeos
Ca ²⁺	- Cálcio
MTI	- Imunidade desencadeada por MAMP
MAMP	- Padrões moleculares micróbio-associado
pSym	- <i>symbiosis plasmids</i>
h _{sn}	- <i>host-specific nodulation</i>
PGPB	- Bactérias promotoras do crescimento vegetal
NH ₄ ⁺	- Amônio
N	- Nitrogênio
FBN	- Fixação Biológica do Nitrogênio
v/v	- volume/volume
rpm	- Rotação por minuto
D.O. ₆₀₀	- Densidade ótica em 600 nanômetros
ng/μl	- nanogramas/microlitros
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pmol/μl	- picomols/microlitros
U/μl	- unidades/microlitro
V	- Volts
pb	- Pares de base
dNTP	- Bases nitrogenadas
UV	- Ultravioleta
M	- Molar
HCCA	- α-ciano-4-ácido hidroxicinâmico
m/z	- massa/carga
EPS	- exopolissacarídeos
MSP	- Main spectra – espectro consenso
ID	- Identificação
GC	- Conteúdo de bases guanina-citosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A VEGETAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA NOS ESTADOS DO PARANÁ E SANTA CATARINA.....	16
2.2 O GÊNERO <i>Mimosa</i>	18
2.3 O PROCESSO DE NODULAÇÃO.....	20
2.3.1 Genes envolvidos no processo de nodulação.....	22
2.3.2 Organismos nodulantes.....	23
2.3.2.1 Alfa-rizóbios (α -rizóbios).....	25
2.3.2.2 Beta-rizóbios (β -rizóbios).....	26
2.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN).....	27
2.4.1 Genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio.....	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 COLETAS DE <i>Mimosa</i> spp.....	32
4.2 DESINFECÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS NÓDULOS E ISOLAMENTO.....	35
4.3 TESTE DE REINOCULAÇÃO E NODULAÇÃO EM <i>Mimosa pudica</i>	35
4.4 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	37
4.4.1 Extração de DNA genômico total.....	37
4.4.2 Amplificação de DNA por PCR.....	37
4.4.3 Purificação e sequenciamento do produto amplificado.....	39
4.4.4 Análise das sequências.....	39
4.4.5 Sequenciamento do DNA genômico.....	40

4.5 TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF.....	41
4.5.1 Preparo das amostras.....	41
4.5.2 Análise das amostras na espectrometria de massa.....	41
5 RESULTADOS.....	43
5.1 COLETAS DE <i>Mimosa</i> spp.....	43
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	47
5.2.1 Identificação através de sequenciamento do gene 16S rRNA.....	47
5.2.2 Classificação taxonômica dos isolados por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	52
5.3 BOX-PCR.....	55
5.4 TESTE DE NODULAÇÃO.....	58
5.5 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF.....	64
5.5.1 Caracterização dos Isolados.....	64
5.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE GENÔMICA.....	72
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO 1 – Laudo de Análise de Solo.....	103
ANEXO 2 – Legenda dos Apêndices 1, 2 e 3.....	105
APÊNDICE 1 – Classificação: Isolados Identificados X não Identificados.....	106
APÊNDICE 2 – Classificação: Isolados X Banco de Dados Biotyper.....	109
APÊNDICE 3 – CLASSIFICAÇÃO: ISOLADOS X <i>Paraburkholderia phymatum</i> STM815 e <i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG19424.....	112
APÊNDICE 4 – Tabela geral de resultado das coletas.....	113

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está no centro de origem do gênero *Mimosa*, possivelmente por ser um país de dimensões continentais, possuindo grande diversidade de biomas e tipos de solo. Este gênero é um dos maiores da família das leguminosas, com mais de 500 espécies distribuídas principalmente nos neotrópicos, sendo sua maior parte distribuída no continente Americano. A sua capacidade de fixar nitrogênio e crescer rapidamente fazem delas plantas importantes para a conservação do solo, restauração ecológica e sistemas de agroflorestas.

Os rizóbios induzem a formação de nódulos nas raízes de leguminosas, com o qual fixam o nitrogênio atmosférico em troca de compostos de carbono das plantas. Esta associação mutualística constitui o principal sistema biológico de fixação de nitrogênio no planeta.

Taxonomicamente, o grupo dos rizóbios mais conhecido estão na classe das Alfaproteobactérias, denominados alfa-rizóbios, que são dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Atualmente, sabe-se que bactérias simbiotes dos gêneros *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* também são nodulantes, e que estas pertencem à classe Betaproteobactérias, estabelecidos então, como beta-rizóbios.

Recentemente, inúmeros trabalhos apresentaram o isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e alfa-rizóbios em nódulos, especificamente de plantas da subfamília *Mimosoideae*.

Anteriormente, acreditava-se que a dominância dessas espécies em nódulos de plantas estava relacionada à regiões de latitude similar do globo terrestre, com predominância do clima tropical e subtropical. Contudo, os estudos mostram que a sua adaptação ecológica tem sido atribuída a solos acidificados e pobres em nutrientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A VEGETAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA NOS ESTADOS DO PARANÁ E SANTA CATARINA

A Mata Atlântica é formada por um conjunto de formações florestais (Florestas: Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Ombrófila Aberta, Estacional Semidecidual e Estacional Decidual) e ecossistemas associados (restingas, manguezais e campos de altitude) que, originalmente, compreendia uma área de aproximadamente 1.300.000 km² em 17 estados brasileiros. No entanto, até os dias atuais, a vegetação nativa foi reduzida em torno de 22% de sua cobertura original e encontram-se em diferentes estágios de regeneração (IBGE, 2012).

Na área costeira do território brasileiro, a Floresta Ombrófila Densa (FOD) compõe a grande área montanhosa atlântica nas encostas voltadas para o mar. A sua característica mais forte é o clima tropical de temperatura elevada (médias de 25°C) e de alta precipitação, bem distribuídas durante todo o ano, o que determina uma situação sem períodos bioecologicamente secos.

A Floresta Ombrófila Mista (FOM ou Floresta de Araucária) é o tipo de vegetação do Planalto Meridional, considerada em seu atual “clímax climático”, e sua principal característica é a presença de araucárias, em geral associada às famílias Lauraceae, Myrtaceae e Rubiaceae, podendo ter uma significativa população de gimnosperma *Podocarpus lambertii* Klotz., quando em altitudes elevadas (IBGE, 2012; LAMMEL, 2007).

Segundo Lammel (2007), espécies da família Fabaceae não são abundantes na Floresta de Araucária. Contudo, como muitas espécies desta família são consideradas plantas pioneiras, em momentos de perturbação ambiental elas podem aparecer por apresentarem crescimento inicial rápido e por terem a capacidade de fixar nitrogênio.

A Floresta Estacional Semidecidual (FES) tem sua vegetação caracterizada pela dupla estacionalidade climática: uma tropical, com época de intensas chuvas de verão seguidas por estiagens acentuadas; e outra subtropical, sem período seco, mas com seca fisiológica provocada pelo intenso frio de inverno, com temperaturas médias inferiores a 15°C (AMBIENTE, 2018).

Como pode-se observar na Figura 1, os estados do Paraná e Santa Catarina fazem parte do bioma da Mata Atlântica. A vegetação da região está sub-dividida em Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista (ou Floresta de Araucária), Floresta Estacional Semidecidual e Estepe, ilustradas na Figura 2.



Figura 1. Biomas do Brasil.

Fonte: o autor, adaptado de Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428, de 2006 (IBGE, 2012).

A Estepe, também é conhecida como “Campos do Sul do Brasil” ou “Campanha Gaúcha”. No Planalto das Araucárias, a Estepe é submetida a clima pluvial subtropical, sem período seco e coexiste com a Floresta Ombrófila Mista (com Araucária), cujas espécies de árvores vão constituir capões e florestas-de-galeria. Por influência, principalmente, da altitude, suporta período frio (temperatura média mensal menor ou igual a 15° C) anual mais pronunciado, de até oito meses; enquanto o período quente (temperatura média mensal menor ou igual a 20° C) é reduzido ou ausente (IBGE, 2012).

Devido a esta diversidade ambiental, os microrganismos que habitam a rizosfera, raízes e nódulos também devem ter uma representatividade importante não só para o gênero *Mimosa*, mas para todo o ecossistema (SIMON et al., 2011).

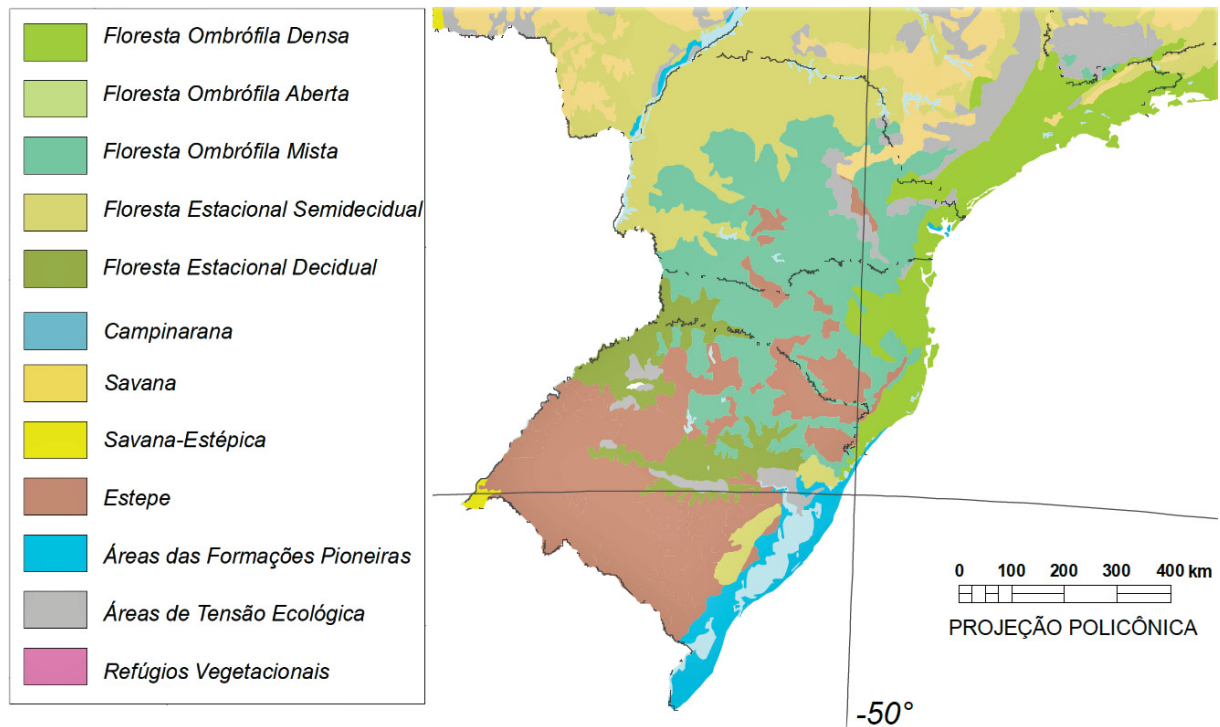


Figura 2. Distribuição regional da vegetação natural do Sul do Brasil.

Fonte: o autor, adaptado de Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428, de 2006 (IBGE, 2012).

2.2 O GÊNERO *Mimosa*

O gênero *Mimosa* está classificado na tribo Mimoseae, subfamília Mimosoideae, a segunda maior pertencente à família Fabaceae, popularmente

conhecida como Leguminosae, e no Brasil possui aproximadamente 346 espécies descritas (LIMA et al., 2014; TOZZI, 2016).

As espécies do gênero *Mimosa* podem ser encontrados em diversos ambientes (Figura 3), sendo que sua maior concentração de diversidade está localizada no Brasil Central, América do Sul subtropical (Paraguai, Argentina, Uruguai e sul/sudeste do Brasil), México, Caribe, em maioria pelas regiões pantropical e subtropical e zonas temperadas do planeta (COUTINHO, 2009; ELIAS, 1981). Secundariamente, são encontrados na África, Índia e até na Austrália (SPRENT et al., 2017).

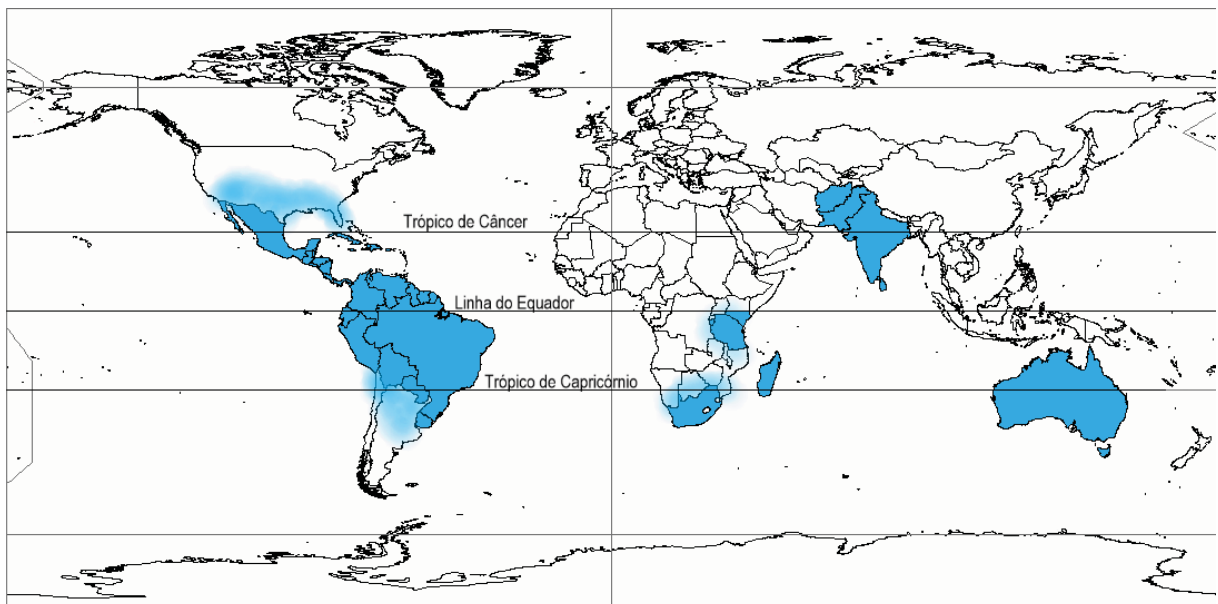


Figura 3. Distribuição geográfica do gênero *Mimosa*.
Fonte: o autor, adaptado de COUTINHO (2009).

O Brasil está no centro de origem do gênero *Mimosa*, e por ser um país de dimensões continentais, localizado em uma faixa tropical e subtropical, possui grande diversidade de biomas e tipos de solo. Devido a isto, o gênero é adaptado tanto com espécies cosmopolitas, que conseguem se desenvolver em qualquer tipo de ambiente, quanto com espécies endêmicas muito restritas, que se desenvolvem em apenas um tipo específico de habitat. As espécies com distribuição cosmopolita são capazes de crescer numa diversidade de habitats incluindo floresta tropical, cerrado, savana, pastagem, floresta subtropical, zonas úmidas, entre outros (SIMON et al., 2011).

As mimosas são econômica e socialmente importantes, pois são usadas em diversas atividades humanas, tais como reflorestamento (*Mimosa caesalpinifolia*), produção de madeira (*Mimosa scabrella*), como planta medicinal (*Mimosa tenuiflora*), e como fonte de lenha por agricultores de subsistência. Sua capacidade de fixar nitrogênio e crescer rapidamente fazem dela plantas importantes para a conservação do solo, regeneração e restauração ecológica e sistemas de agroflorestas (SIMON et al., 2011).

2.3 O PROCESSO DE NODULAÇÃO

O nódulo é um órgão simbiótico que abriga uma associação mutualística entre plantas leguminosas e rizóbios, onde estes rizóbios fixam o nitrogênio fornecendo à planta em troca de compostos fotossintetizados de carbono (SUZAKI et al., 2015). Uma das principais função desta estrutura é a de proteger a enzima nitrogenase contra o O₂ que inativa a enzima (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A nodulação em leguminosas acontece a partir de uma conversa molecular envolvendo mecanismos complexos de sinalização e transdução moleculares. Assim, tanto o rizóbio quanto a leguminosa se reconhecem e iniciam o processo, representado na Figura 4 (LARANJO et al., 2014).

O primeiro passo deste processo é a liberação de flavonóides pelas raízes das leguminosas, os quais serão reconhecidos pela bactéria diazotrófica, ocorrendo a ativação da expressão dos genes *nod* específicos nas bactérias (DEBELLÉ et al., 2001). Os genes sintetizam moléculas conhecidas como Fatores Nod (NF), que são lipoquitooligossacarídeos (LQO) essenciais para a formação dos nódulos, determinantes para a especificidade entre bactéria-hospedeiro e controle da imunidade da planta durante a estruturação simbiótica (GOURION et al., 2014).

Os NF são reconhecidos pela planta hospedeira através de receptores transmembrana específicos. Predominantemente agem nas células epidérmicas e corticais, induzindo a despolarização da membrana plasmática através da oscilação de Ca²⁺ (EHRHARDT et al., 1992). Simultaneamente, também induzem a expressão

de genes vegetais que codificam nodulinas, proteínas nódulo-específicas essenciais para a formação dos nódulos (GOVERS et al., 1986; GLOUDEMANS e BISSELING, 1989). Esta infecção, exemplificada na Figura 5, estimula a multiplicação celular e, então, acontece a formação de primórdio nodular, abrigando grandes quantidades de rizóbios, que lotam as células simbióticas onde as bactérias poderão exercer com eficiência a fixação de nitrogênio, então chamados simbiossomos (GOURION et al., 2014).

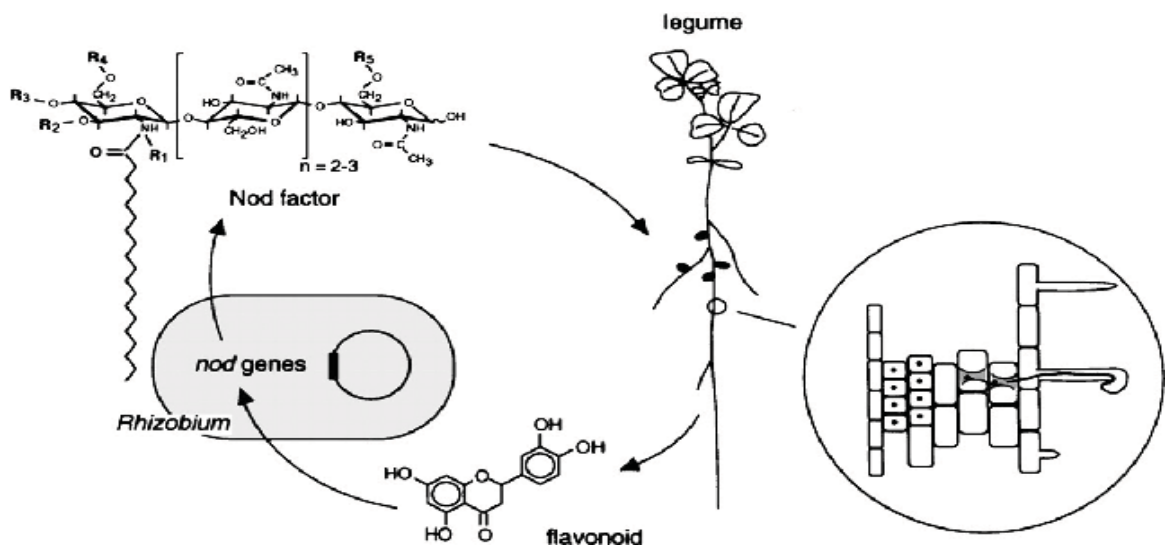


Figura 4. Sinalização molecular entre rizóbio e leguminosa.
Fonte: Lindström et al. (2010).

A extrema importância dos NF para a sinalização e formação de nódulos já é conhecida e bem caracterizada. Todavia, a sua produção permanece ativa na zona de fixação de nitrogênio em nódulos de *M. truncatula*, ou seja, quando o nódulo já está formado. Isto sugere que seu papel vai além da organogênese, desempenhando uma função imunossupressora em MTI (*MAMP-triggered immunity* – imunidade desencadeada por MAMP), ativada pelos MAMPs (*microbe-associated molecular patterns* – padrões moleculares micróbio-associado) nas células radiculares horas após o contato com um rizóbio (GOURION et al., 2014).

Outras moléculas e proteínas são necessárias para que ocorra todo o processo de formação de nódulos, além dos NF. Pode-se afirmar, então, que rizóbios e leguminosas co-evoluíram em uma complexa troca de sinais para evitar a ativação da imunidade das plantas, uma vez que o rizóbio também perdeu características patogênicas, desenvolvendo assim mecanismos de reconhecimento

e especificidade entre rizóbio-hospedeiro (GOURION et al., 2014; BROUGHTON et al., 2006).

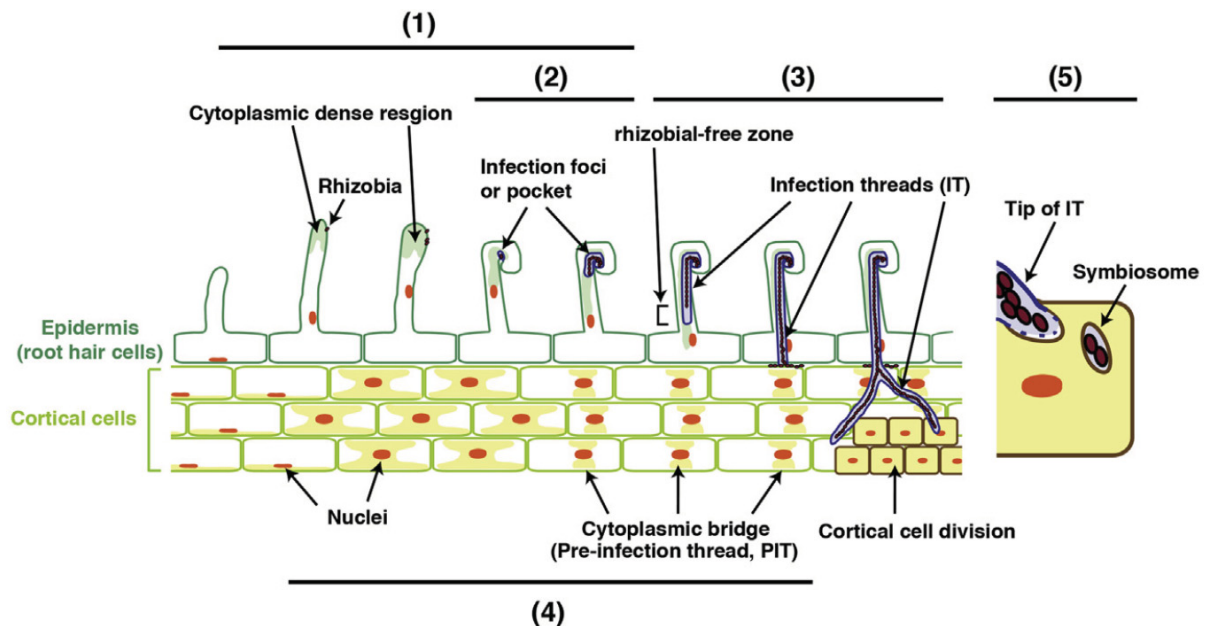


Figura 5. Mecanismo de infecção do rizóbio na raiz de leguminosa.

(1) o rizóbio presente na rizosfera reconhece a sinalização de flavonoides e responde liberando NF. O pêlo radicular inicia o processo de enrolamento na ponta. (2) Após o rizóbio estar enrolado, a célula do pêlo radicular inicia o processo de degradação da parede celular e invaginação da membrana, dando origem ao cordão de infecção. (3) Este cordão de infecção é alongado, simultaneamente ao movimento nuclear e fluxo citoplasmático. (4) Durante a infecção, as células corticais da raiz formam uma ponte citoplasmática que guia o alongamento do cordão de infecção. (5) Quando este cordão encontra células corticais recém-divididas, a membrana do cordão se rompe liberando o rizóbio dentro da célula, dando origem ao simbiosomo.

Fonte: Suzaki et al. (2015).

2.3.1 Genes envolvidos no processo de nodulação

Os principais genes bacterianos que fazem parte do processo de infecção na planta são chamados “genes de nodulação” ou genes *nod* (genes *nod/nol/noe*). Eles possuem esta nomenclatura devido às suas funções de sintetizar, regular, modificar ou transportar um fator de sinalização, chamados lipoquitooligossacarídeos (fatores Nod – NF), ou sua co-regulação com outros genes (MASSON-BOIVIN e SACHS, 2018; FERGUSON, 2013).

Ferguson (2013) propôs a classificação e função dos genes *nod/nol/noe*, conhecidos até então, em quatro grupos de genes que mediam os estágios da

nodulação de modo geral, descritos a seguir. O primeiro grupo proposto são os genes regulatórios, sendo o mais conhecido o *nodD*, que tem sido identificado na maioria dos rizóbios (SHARMA et al., 1993). Ele faz parte da família de proteínas reguladoras transcricionais, que se liga ao promotor de operons *nod* e ativa a transcrição ao reconhecer o flavonóide sinalizado pela planta. Outros genes deste grupo são: *nodVW*, *noIAR* e *syrM*. Também é responsável pela regulação do Sistema de Secreção T3 (T3SS), que permitem reconhecer um maior número de sinais indutores e assim ampliar o número de hospedeiros (FERGUSON, 2013). Os T3SS estão amplamente presentes nos rizóbios, sugerindo que estes sistemas coevoluíram de maneira positiva para fins simbióticos (MASSON-BOIVIN e SACHS, 2018).

O segundo grupo proposto é caracterizado pelos genes *nod* de síntese (*nodABC*) Esses genes estão agrupados ou em um plasmídeo chamado pSym (*symbiosis plasmids*) ou estão no cromossomo da bactéria (SHARMA et al., 1993; LARANJO et al., 2014). Estes genes conservaram passos no processo de nodulação que, evolutivamente, são comuns a todas as simbioses rizóbio-leguminosa (SHARMA et al., 1993). Também encontram-se classificados neste grupo os genes *nodMEF* (FERGUSON, 2013). O terceiro grupo é caracterizado pelos genes de modificação de Fatores Nod (*nodGHLSUPQXZ*, *noILOXWBTUV*, *noeCDEIJKL*), que não estão presentes obrigatoriamente em todos os rizóbios, e são responsáveis pelos genes *hsn* (*host-specific nodulation*) (SHARMA et al., 1993). O quarto grupo é caracterizado pelos genes de transporte (*nodIJTO*).

2.3.2 Organismos nodulantes

Os rizóbios são bactérias nodulantes de leguminosas, que vivem como saprófitas no solo ou simbiontes facultativas em plantas. Eles induzem a formação de nódulos nas raízes, e na ausência ou baixa concentração de nitrogênio no solo, são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à planta em troca de compostos fotossintetizados de carbono. Esta simbiose constitui o principal sistema

biológico de fixação de nitrogênio na Terra (SHAMSELDIN et al., 2017; LARANJO et al., 2014).

O termo “rizóbio” foi usado para nomear as primeiras bactérias encontradas em nódulos, classificadas como gênero *Rhizobium*, no século XIX. Contudo, após o surgimento de análises filogenéticas baseadas em sequências parciais do gene 16S rRNA, outros gêneros foram identificados (*Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, entre outros - Figura 6) (LARANJO et al., 2014; GYANESHWAR et al., 2011).

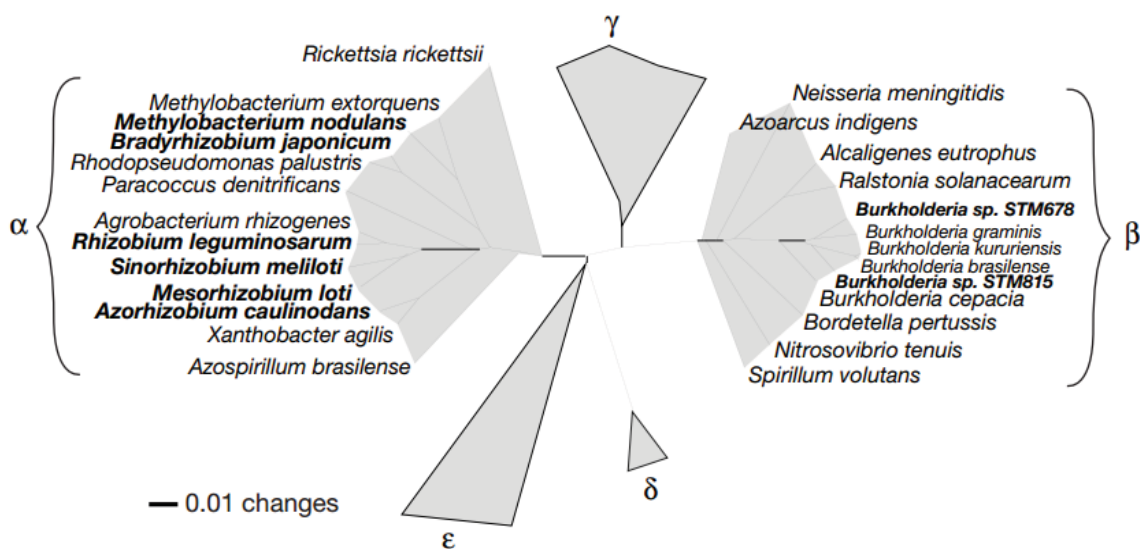


Figura 6. Distribuição taxonômica dos organismos com capacidade nodulatória entre o grupo das Proteobactérias.
Fonte: Moulin et al. (2001).

Eles são divididos em dois subgrupos: de crescimento rápido produzindo meio acidificado (espécies de *Rhizobium*), e de crescimento lento produzindo meio básico (espécies de *Bradyrhizobium*). Os rizóbios de rápido crescimento nodulam hospedeiros específicos, enquanto que os de lento crescimento não possuem uma especificidade tão rigorosa de hospedeiros (SHAMSELDIN et al., 2017; TAK et al., 2017).

Um rizóbio só é considerado eficaz quando é capaz de nodular e fixar nitrogênio nos nódulos em uma ou mais espécies de leguminosa, além de fazer parte dos ramos de Alfa ou Betaproteobacteria (SPRENT et al., 2013). Ademais, eles podem desempenhar o papel de bactérias promotoras do crescimento vegetal

(PGPB) não-simbióticas, como no caso de culturas de não-leguminosas economicamente importantes, tais como trigo, milho e arroz (LARANJO et al., 2014).

Como ilustrado na Figura 6, pode-se observar que, taxonomicamente, as bactérias nodulantes já são conhecidas por pertencerem ao grupo das Alfaproteobactérias (alfa-rizóbios), sendo seus exemplos mais conhecidos o *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, e *Sinorhizobium meliloti*, e *Azospirillum brasilense*, que por sua vez, não nodula, mas é igualmente importante na fixação do nitrogênio.

A partir dos anos 2000, foi descoberto que bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus* também são nodulantes, e que estas pertencem à classe Betaproteobactérias, estabelecidos então como beta-rizóbios (MOULIN et al., 2001; BONTEMPS et al., 2010; LARANJO et al., 2014).

2.3.2.1 Alfa-rizóbios (α -rizóbios)

Os rizóbios da classe Alfaproteobactéria são denominados α -rizóbios, e até o momento possui 16 gêneros que estão classificadas em 6 famílias: Rhizobiaceae (gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Allorhizobium*, *Pararhizobium* e *Shinella*), Phyllobacteriaceae (gêneros *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium* e *Aminobacter*), Bradyrhizobiaceae (gêneros *Bradyrhizobium*, *Blastobacter* e *Photrhizobium*), Hyphomicrobiaceae (gêneros *Azorhizobium* e *Devosia*), Methylobacteriaceae (gêneros *Methylobacterium* e *Microvirga*) e Brucellaceae (gênero *Ochrobacterium*). Todos estes taxons são entrelaçados filogeneticamente com bactérias não-simbiontes. O gênero *Rhizobium* é o mais diverso com 98 espécies, sendo 69 isoladas de várias leguminosas hospedeiras, e 29 espécies não simbiotes. O gênero *Ensifer* possui 21 espécies, *Mesorhizobium* possui 40 espécies, *Bradyrhizobium* possui 37 espécies e *Azorhizobium* possui 3 espécies (SHAMSELDIN et al., 2017; TAK et al., 2017).

2.3.2.2 Beta-rizóbios (β -rizóbios)

Os rizóbios da classe Betaproteobactéria são chamados de Beta-rizóbios (GYANESHWAR et al., 2011). O primeiro relato de β -rizóbios nodulantes apareceu em 2001 para isolados *Ralstonia taiwanensis* (agora *Cupriavidus taiwanensis*) de *Mimosa* spp. invasoras em Taiwan (CHEN et al., 2001), e por *Paraburkholderia* spp. isoladas de leguminosas na África do Sul e Guiana Francesa (MOULIN et al., 2001; TAK et al., 2017).

Inicialmente, acreditava-se que os β -rizóbios teriam uma grande afinidade apenas com o gênero *Mimosa* (Mimosoideae), e o Brasil sendo considerado o grande centro da diversidade de *Paraburkholderia* simbióticas. Mais tarde, várias leguminosas papilionoid endêmicas da África do Sul (*Cyclopia*, *Lebeckia*, *Rhynchosia*) foram relatadas sendo noduladas por *Paraburkholderia* spp. também (GYANESHWAR et al., 2011). Então, a África do Sul passou a ser considerada como o centro da diversidade de *Paraburkholderia* papilionoid-nodulante (TAK et al., 2017).

O gênero mais comum no grupo dos β -rizóbios é a *Paraburkholderia*, que também tem patógenos de plantas e animais. Criado em 1992, este gênero pertence à classe das Betaproteobactérias e conta atualmente com 117 espécies descritas (LPSN, 2018). Colonizam diversos nichos ecológicos, desde plantas, solos contaminados e seres humanos, sendo um importante componente da comunidade microbiana do solo. Há diversas espécies que são patogênicas oportunistas a humanos, como *Burkholderia cepacia*, *B. gladioli* e *B. fungorum*, *B. cenocepacia*. Este último é caracterizado como o mais virulento e está associado com a alta taxa de mortalidade entre pacientes com fibrose cística (VIAL et al., 2007).

Numa análise filogenética das *Burkholderia*, os β -rizóbios estão em um clado separado das espécies de *Burkholderia* patogênicas (VIAL et al., 2007; SPRENT et al., 2013). Considerando esta característica, Sawana e colaboradores (2014) propuseram que, as espécies de nicho ambiental fossem locadas em um novo gênero, as *Paraburkholderia*. Com toda essa diversidade, elas têm potencial como modelo para entender como a patogenicidade e simbiose surgiram, proliferaram-se,

desenvolveram-se e segregaram-se dentro de um único gênero (BONTEMPS et al., 2010; SPRENT et al., 2013).

Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, agora nomeadas como *Paraburkholderia*, apresentam ampla distribuição, se associam com plantas não-leguminosas e podem formar nódulos em leguminosas. Baseado em Shamseldin e colaboradores (2017), até o momento são dezoito espécies nodulantes já encontradas: *Paraburkholderia tuberum* (VANDAMME et al. 2002), *P. phymatum* (VANDAMME et al., 2002), *P. mimosarum* (CHEN et al., 2006), *P. nodosa* (CHEN et al., 2007) e *P. sabiae* (CHEN et al., 2008), *P. caribensis* (CHEN et al., 2003a), *P. diazotrophica* (SHEU et al., 2012b), *P. phenoliruptrix* (BOURNAUD et al., 2013), *P. rhynchosiae* (DE MEYER et al., 2013a), *P. sprentiae* (DE MEYER et al., 2013b), *P. symbiotica* (SHEU et al., 2012a), *P. piptadeniae* e *P. ribeironis* (BOURNAUD et al., 2017), *P. dilworthii* (DE MEYER et al., 2014), *P. kirstenboschensis* (STEENKAMPA et al., 2015), *Paraburkholderia* sp. 1 e *Paraburkholderia* sp. 2 (BONTEMPS et al., 2010), *Paraburkholderia* sp. 3 (PARKER et al., 2007).

O segundo gênero de β -rizóbios encontrado foi *Cupriavidus*. O primeiro isolado foi originalmente classificado como *Ralstonia taiwanensis* por CHEN et al. (2001). Em 2004, Vaneechoutte et al. transferiu a espécie para *Wautersia*, e posteriormente foi reclassificada para *Cupriavidus taiwanensis*. O segundo isolado, *Cupriavidus necator*, foi isolado a primeira vez de um nódulo de *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena leucocephala* no Brasil por Florentino et al. (2009), e confirmada como nodulante de *Mimosa* spp. por Da Silva et al. (2012).

2.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

O gás nitrogênio compõe cerca de 78% da atmosfera terrestre, sendo o mais abundante. Encontra-se numa forma combinada (N_2) que não é assimilável pela maioria dos organismos devido à sua baixa reatividade (VITOUSEK et al., 1997; KIM e REES, 1994). Apenas alguns procariontes (denominados diazotrofos) são capazes

de converter o nitrogênio gasoso (N_2) em amônio (NH_4^+), um produto de mais fácil assimilação metabólica (RAYMOND *et al.*, 2004).

Este amônio é rapidamente convertido em aminoácidos ou amidas para produção de proteínas e peptídeos que facilitam seu desenvolvimento. O Nitrogênio (N) incorporado na bactéria diazotrófica é liberado no ambiente quando ela morre na forma de aminoácidos, que se tornarão mineralizados e disponíveis para outras bactérias e/ou plantas (JAMES, 2017).

Esta reação, denominada Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), é um dos dois maiores processos que regulam a vida no planeta, junto a decomposição orgânica, perdendo apenas para a fixação biológica de carbono (fotossíntese) (KIM e REES, 1994; VITOUSEK *et al.*, 1997), sendo um processo vital para a manutenção do ciclo do nitrogênio. Também é vista com interesse por suas aplicações na agricultura, pois o nitrogênio é um nutriente limitante em muitos ecossistemas naturais e agrícolas (DIXON e KAHN, 2004).

Na ausência de interferência humana, não há quantidade suficiente de nitrogênio prontamente disponível no ambiente capaz de sustentar a população humana. A deficiência de nitrogênio é geralmente suprida com o uso de fertilizantes contendo amônio produzido pelo processo de Haber-Bosch (CREWS e PEOPLES, 2004), que requerem alto consumo de energia para sua produção (MELILLO, 1996; KIM e REES, 1994), e cuja aplicação tem sérias implicações ambientais (CREWS e PEOPLES, 2004; DIXON e KAHN, 2004; GILLER e CADISCH, 1995). Assim, o uso da FBN na agricultura representa um avanço considerável ao se tratar de sustentabilidade (GILLER e CADISCH, 1995), devido ao baixo custo financeiro e ambiental em relação ao processo industrial.

A eficiência do uso da FBN na agricultura é comprovada por muitos exemplos bem-sucedidos, particularmente com bactérias conhecidas como rizóbios, associadas a leguminosas; a FBN é em grande parte responsável pelo sucesso das lavouras de soja nos últimos anos no Brasil (DOBEREINER, 1997). Não se deve esquecer, porém, o aumento de produtividade de culturas de cereais e outras gramíneas cultivadas na presença de diazotrofos associativos (BALDANI *et al.*, 1987; BODDEY *et al.*, 1995; KAPULNIK *et al.*, 1983).

Apenas uma parcela relativamente pequena de espécies de procariotos possui a enzima nitrogenase, que são capazes de reduzir o N_2 em N biologicamente disponível. Estes microrganismos são chamados de fixadores de N_2 ou diazotróficos. Contudo, são eles os mediadores do processo de FBN, que, na sua maioria, envolve as formas de simbiose microrganismo-planta vascular (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Existem três tipos de organismos diazotróficos, sendo o primeiro os de vida livre, o segundo aqueles que vivem associados com outros organismos e, por último, aqueles que vivem em simbiose com outros organismos. A mais eficiente relação desenvolvida foi a simbiose de certas bactérias com plantas da família leguminosa. Neste processo, são formadas estruturas especializadas, os nódulos, onde as bactérias possuem condições para expressar sua máxima eficiência. Posteriormente, descobriu-se que bactérias diazotróficas vivem em associação na rizosfera ou tecidos de plantas não-leguminosas, contribuindo para o desenvolvimento das plantas. Entretanto, grandes esforços têm sido empenhados no entendimento e melhor exploração desse sistema, visto que plantas beneficiadas, como milho, trigo e arroz, são a base da alimentação humana.

Bactérias da classe Proteobactérias são fixadoras de N_2 comuns. Pelos nódulos apresentarem abundância em suprimento de nutrientes e seu ambiente de proteção fechado livre de O_2 , eles são um nicho atraente para uma grande variedade de bactérias não simbióticas, que têm a capacidade de colonizar plantas oportunisticamente, principalmente aquelas que possuem a capacidade de fixação de N_2 (GYANESHWAR et al., 2011).

2.4.1 Genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio

A Fixação Biológica de Nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (BURRIS, 1991) e requer grande concentração desta enzima (10 a 20% do total de proteína celular). A redução do dinitrogênio tem um alto custo energético para a célula (16 mols de ATP para cada mol de N_2 reduzido), é bastante lenta

(DIXON e KAHN, 2004), e só pode ocorrer na ausência de oxigênio, devido à sensibilidade do cofator de Ferro-molibdênio (FeMoCo) da nitrogenase ao se desnaturar em contato com o O₂ (SHAH e BRILL, 1977).

O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas metaloproteínas distintas: a proteína Fe (codificada pelo gene *nifH*), ou dinitrogenase redutase, e a proteína FeMo, ou dinitrogenase (codificada pelos genes *nifDK*) (HOWARD e REES, 1996). A atividade catalítica é exclusiva da proteína FeMo, mas é dependente da redução de FeMo pela proteína Fe (BURRIS, 1991).

Embora os genes *nifHDK* sejam bastante conservados, a capacidade de fixar nitrogênio está presente em organismos filogeneticamente muito distantes como proteobactérias, cianobactérias e arqueias (RAYMOND *et al.*, 2004; ZEHR *et al.*, 2003), e a regulação do processo de fixação ocorre através de mecanismos distintos (DIXON e KAHN, 2004). Sugere-se que essa ampla distribuição filogenética dos genes *nif* seja resultado da perda de genes *nif* presentes em um ancestral metanogênico, seguida de transferência horizontal de genes para linhagens bacterianas (RAYMOND *et al.*, 2004; ZEHR *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as bactérias de nódulos de *Mimosa* spp. nos estados do Paraná e Santa Catarina, para compreensão da diversidade de bactérias simbióticas e associativas, e seus genes simbióticos, quando possuírem.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Gerar uma nova coleção de rizóbios isolados a partir de nódulos de *Mimosa* spp. coletados em diferentes solos e altitudes nos estados do Paraná e Santa Catarina;
- Classificar taxonomicamente estes isolados através de sequências de 16S rRNA, *recA*, *nifH* e *nodC*;
- Determinar a capacidade de nodulação dos isolados em *Mimosa pudica*;
- Caracterizar em detalhes, por meio de sequenciamento genômico, isolados selecionados para identificação de espécies;
- Enriquecer o banco de dados Biotyper com espectros de massa MALDI-TOF destes isolados selecionados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETAS DE *Mimosa* spp.

A primeira coleta das leguminosas foi realizada em novembro de 2014 pelos Dr. Daniel R. Lammel (UFPR), Dr. Euan K. James (The James Hutton Institute) e o botânico especialista em *Mimosa* spp., Dr. Osmar dos Santos Ribas (diretor do Jardim Botânico do município de Curitiba, Paraná). Neste momento, foi coletado material vegetal (parte aérea, flores e frutos) para identificação de plantas, sementes para posterior estudo de re-inoculação das bactérias, nódulos de raízes e solo próximo ao sistema radicular.

Ao total, foram amostrados 25 exemplares de plantas em diferentes relevos e formações geológicas do estado do Paraná, de forma a representar diferentes solos encontrados nas seguintes regiões: Pontal do Paraná, Paranaguá e Morretes (Planície Litorânea); Piraquara (Serra do Mar); Balsa Nova (1º Planalto) e Ponta Grossa (2º Planalto).

Amostras dos solos nos pontos de amostragem das plantas foram coletadas e submetidas a análises físico-químicas realizadas pelo Laboratório de Fertilidade do Solo – Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, na UFPR (ANEXO 1 – Laudo de Análise de Solo).

Em novembro de 2015, foi realizada uma segunda coleta de *Mimosa* spp. por mim, Dr. Daniel R. Lammel (UFPR) e Dr. Euan K. James (The James Hutton Institute). Parte do material vegetal (parte aérea, flores e frutos) foi enviado a equipe técnica do herbário do Jardim Botânico, Curitiba – PR, para identificação das espécies, e as sementes, nódulos de raízes e solo rizosférico foram estocados. No total, foram amostrados 9 exemplares de plantas em diferentes relevos da região da Serra do Mar, em Campos do Quiriri, Garuva – SC.

Em dezembro de 2016, a terceira coleta foi realizada no Piraquara (Morro do Canal) pelo Dr. Daniel R. Lammel, duas amostras da base da montanha, duas no

meio da montanha e duas no topo da montanha. Em 2017, foram realizadas novas coletas nos pontos de Palmeira/PR, Porto Amazonas/PR, Piraquara/PR, Morretes/PR e um novo local em Campo Magro/PR, pelo doutorando Steve J. F. Alves, e na rodoviária de Blumenau/SC, mandado pela equipe do Herbário FURB de Blumenau. Todos os pontos estão apresentados na Figura 7, e descritos na Tabela 1.

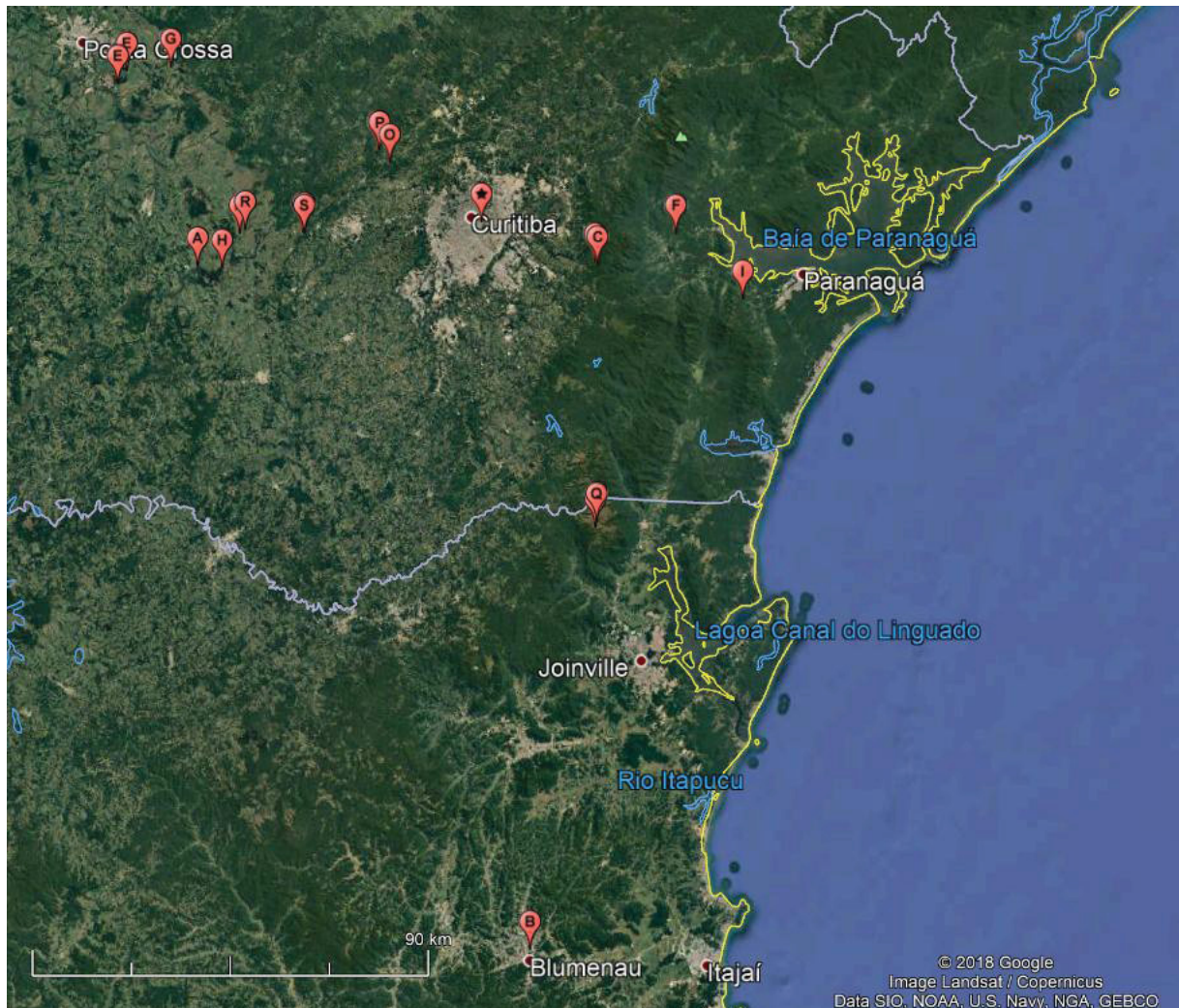


Figura 7. Pontos de coleta de espécimes de *Mimosa* no leste do estado do Paraná e nordeste de Santa Catarina.

Legenda: (★) Curitiba; (E) Estrada da Embrapa, Ponta Grossa; (G) Passo do Pupo, Ponta Grossa; (A) Ponte ferroviária, Porto Amazonas; (H) Hidrelétrica de Porto Amazonas; (R) Recanto dos Papagaios, Palmeira; (S) São Luis do Purunã, Balsa Nova; (O) Pedreira do Morro da Palha, Campo Magro; (P) Morro da Palha, Campo Magro; (C) Morro do Canal, Piraquara; (F) Fazenda Gerds, Morretes; (I) Morro do Inglês, Paranaguá; (Q) Campos do Quiriri, Garuva – SC; (B) Rodoviária de Blumenau – SC.

Fonte: Adaptado de Google Earth, o autor (2017).

Tabela 1. Pontos de coleta e identificação de espécimes de *Mimosa* spp. nos estados do Paraná (PR) e Santa Catarina (SC).

Região (estado)	Data	Coordenadas dos sítios	Elevação	Distância média	Isolados (seq/MALDI)	Plantas
São Luis do Purunã Balsa Nova (PR)	2014 2014 2017	25°28'20.6"S 49°38'26.0"W 25°28'06.6"S 49°38'22.4"W 25°28'10.7"S 49°38'38.1"W	1.203 m 1.194 m 1.172 m média 1.190 m variação 31 m	Entre sítios 452 m De Curitiba 40,7 km	80 (33/24)	<i>M. dolens</i> var. <i>latifolia</i> (E) <i>M. gymnas</i> <i>Mimosa</i> sp.1
Recanto dos Papagaios Palmeira (PR)	2014 2017	25°28'35.0"S 49°47'10.5"W 25°28'07.5"S 49°46'25.2"W	971/969/966/9 73/974 m 987 m média 973 m variação 21 m	Entre sítios 1,53 km De Curitiba 54,3 km	83 (23/17)	<i>M. dryandroides</i> var. <i>extratropica</i> (E) <i>M. daleoides</i> <i>M. dolens</i> (E) <i>M. lanata</i> (E) <i>M. pilulifera</i> var. <i>pseudincana</i>
Embrapa Ponta Grossa (PR)	2014 2014	25°10'51.0"S 50°04'31.1"W 25°09'16.9"S 50°03'21.6"W	826 m 928 m média 877 m variação 102 m	Entre sítios 3,53 km De Curitiba 89,7 km	14 (7/0)	<i>M. flocculosa</i> <i>M. regnellii</i> var. <i>exuta</i>
Passo do Pupo Ponta Grossa (PR)	2014	25°08'40.6"S 49°57'22.9"W	1.023 m	Entre sítios 0 m De Curitiba 80,9 km	8 (0/0)	<i>M. paranapiacabae</i> (E)
Morro do Canal Piraquara (PR)	2014 2016 2017	25°30'55"S 48°58'53"W 25°30'52.6"S 48°59'16.8"W	1.359 m 1.359 m 1.313 m Média 1.336 m variação 46 m	Entre sítios 676 m De Curitiba 26,5 km	94 (53/34)	<i>M. congestifolia</i> (E) <i>M. pseudocallosa</i> (E)
Fazenda Gerds Morretes (PR)	2014 2015	25°26'43.4"S 48°48'36.3"W	22/23 m 22 m Média 23 m variação 1 m	Entre sítios 0 m De Curitiba 43,3 km	47 (30/13)	<i>M. pudica</i> <i>M. bimucronata</i>
Morro do Inglês Paranaguá (PR)	2014	25°34'17.6"S 48°39'16.9"W 25°34'17.6"S 48°39'16.9"W	50 m 50 m Média 50 m variação 0 m	Entre sítios 0 m De Curitiba 59,6 km	16 (15/3)	<i>Machaerium stipitatum</i> <i>M. pudica</i> var. <i>hispida</i>
Trilha do Morro da Palha Campo Magro (PR)	2017	25°17'57.8"S 49°28'52.3"W 25°17'59.6"S 49°28'45.5"W 25°19'27.9"S 49°27'17.0"W	1.038 m 1.083 m 812 m Média 977,6 m variação 226 m	Entre sítios 3,7 km De Curitiba 26,6 km	9 (0/9)	<i>Mimosa</i> sp.2 <i>Mimosa scabrella</i>
Rodoviária Blumenau (SC)	2017	26°53'38.94"S 49°4'8.76"W	21 m	Entre sítios 0 m De Curitiba 212 km	33 (0/30)	<i>M. pudica</i>
Campos do Quiriri Guarua (SC)	2015	26°1'46.36"S 48°57'33.62"W 26°2'24.50"S 48°57'41.62"W	1.538 m 1.538 m Média 1.538 m variação 0 m	Entre sítios 1,2 km De Curitiba 70 km	137 (120/18)	<i>M. piscatorum</i> <i>M. murex</i> Barneby (E) <i>Mimosa</i> sp.3 <i>M. scabrella/lanata</i> <i>M. hirsutula</i> (E)
Rio Iguaçu Hidrelétrica de Porto	2017	25°32'51.54"S 49°49'21.02"W 25°32'41.10"S	769 m 787 m Média 778 m	Entre sítios 5,6 km De Curitiba	20 (0/20)	<i>M. scabrella</i> <i>M. strobiliflora</i> (E)

Amazonas (PR)		49°52'41.80"W	variação 18 m	65 km		
---------------	--	---------------	---------------	-------	--	--

(E) espécie endêmica.

4.2 DESINFECÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS NÓDULOS E ISOLAMENTO

Em uma capela de fluxo laminar, os nódulos foram alocados em tubos de plástico de fundo reto de 2,0 mL e passaram por um processo de desinfestação superficial, sendo: 30 segundos (s) em etanol absoluto e 30 s em solução de hipoclorito de sódio 6% (v/v). Os nódulos foram lavados 4 vezes com água destilada estéril por 1 min cada vez.

Com o intuito de isolar as amostras de nódulos, após desinfecção superficial, estes foram triturados em solução NaCl 0,9% estéril no mesmo tubo com um bastão de vidro. Esse triturado foi semeado em placa de petri contendo o meio de cultura YMA com vermelho congo (VINCENT, 1970), pois cada espécie absorve o corante de maneira singular, facilitando a diferenciação das colônias, pela técnica de esgotamento. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 5 dias.

As colônias com produção elevada de exopolissacarídeos foram repicadas em meio TY (Tryptona-Yeast; HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) pH 6,8 para facilitar a manipulação nos procedimentos moleculares, pois TY não estimula a produção de exopolissacarídeos. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 2 dias.

As placas eram vistoriadas diariamente, até o quinto dia, para isolamento de novas colônias crescidas durante este período. As que cresceram, foram repicadas para placas de petri novas e individuais, contendo o mesmo meio de cultivo, visando a verificação do isolamento total de cada colônia e viabilidade celular. Em seguida, foram estocadas em glicerol 50% em freezer -20°C, e utilizadas nas etapas posteriores.

4.3 TESTE DE REINOCULAÇÃO E NODULAÇÃO EM *Mimosa pudica*

Algumas bactérias selecionadas, isoladas de nódulos de *Mimosa* spp., foram reinoculadas em *Mimosa pudica* para avaliar sua capacidade de nodulação. Para os testes, foi montado um sistema com vasos de 500 ml contendo um círculo de papel-filtro em cada base e vermiculita como substrato. Este sistema foi envolto em sacos plásticos e esterilizado em autoclave a 120°C, 1 atm por 20 minutos. Para nutrição/irrigação das plantas, foi usado meio Sarruge (1975), sem adição de nitrogênio.

Em paralelo, sementes de *M. pudica*, fornecidas pela Embrapa Agrobiologia – Seropédica/RJ, tiveram sua superfície esterilizada e sua dormência quebrada com ácido sulfúrico puro por 30 s, e depois adicionado 100 ml de água destilada estéril por mais 30 s, em seguida lavadas com água destilada 4 vezes. As sementes foram colocadas em placas de petri com ágar-água e embrulhado com papel alumínio para germinação em estufa a 28°C. Como o tempo de germinação das sementes é variável, foi esperado três dias, para então fazer a transferência das plântulas para os vasos (três plântulas por vaso).

Duas estirpes de beta-rizóbios já conhecidos por nodularem *Mimosa pudica* foram usadas como controle positivo de nodulação, *Burkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424, gentilmente cedidos pelo Dr. Euan K. James (James Hutton Institute). Os isolados e estirpes controle foram inoculados em 10 ml de meio YMB por dois dias em *shaker* a 28°C em 120 rpm.

Após o nascimento do cotilédone do substrato, foi inoculado 100 µl de uma cultura de bactéria, em D.O.₆₀₀ de 1,0, na base do caule de cada plântula, e colocado mais esferas de polipropileno de 0,5 mm estéreis sobre a vermiculita com intuito de proteger o substrato de possíveis contaminações. Em seguida, os vasos com as plântulas foram colocadas em uma câmara de vegetação (Conviron MTR30) com fotoperíodo de 12h/12h, 28°C no período claro e 25°C no período escuro, umidade constante de 70%, sendo regadas com 100 ml de solução Sarruge, sem adição de nitrogênio, a cada dois dias.

Depois de 30 dias, as raízes das plantas crescidas foram analisadas, verificando a presença ou ausência de nódulos. As que apresentaram formação de

nódulos, tiveram 10 nódulos coletados para re-isolamento das bactérias, como descrito na seção 4.2.

4.4 MANIPULAÇÃO DE DNA

4.4.1 Extração de DNA genômico total

A extração de DNA total genômico dos isolados dos nódulos foi realizada através do protocolo adaptado de TADRA-SFEIR (2011). Em seguida, o DNA extraído foi quantificado em NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) para determinação da concentração em ng/μl e estocado a -20 °C. Uma alíquota de cada DNA foi utilizada para a diluição da concentração a 20 ng/μl para uso contínuo dos experimentos a posteriori.

4.4.2 Amplificação de DNA por PCR

Amplificações foram realizadas para o gene 16S rRNA, feitas direto da colônia de cada isolado. O sistema utilizado como base para as reações de amplificação direto da colônia foi: 0,5 μl de dNTP (5 mmol/l), 0,3 μl de cada oligonucleotídeo iniciador direto e reverso (10 pmol/μl – Tabela 2), 1 μl de solução tampão 10x e 0,05 μl de DreamTaq (5U/μl) (Thermo Scientific™ DreamTaq™ DNA Polymerase), e 7,85 μl de água ultrapura para completar 10 μl. Se a amplificação utilizava DNA molde extraído, era adicionado 1 μl deste e descontado da água.

O programa utilizado no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies) para o gene 16S rRNA foi: desnaturação inicial (5 min a 95°C); 25 ciclos de desnaturação (30 s a 95°C), anelamento (15 s a 58°C), e extensão (40 s a 72°C); e extensão final (7 min a 72°C). Após a reação de amplificação, as amostras

foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, numa corrente elétrica de 55 V por 2 horas, coradas com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 15 min e fotografadas sob luz UV.

Tabela 2. Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência alvo	Sequência 5'→3'	Comprimento (pb)	Conteúdo GC (%)	Referência
27f	Gene 16S rRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	50	Lane et al., 1991
1492r	Gene 16S rRNA	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	21	47,62	Lane et al., 1991
<i>nif</i> H-F-Lag	Nitrogenase reductase	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	23	47,83	Laguerre et al., 2001
<i>nif</i> H-R-Lag	Nitrogenase reductase	AGCATGTCYTCAGYTCNTCCA	22	40,91	Laguerre et al., 2001
<i>nif</i> H-Cup F	Nitrogenase reductase	CCTTTTATGGTAAAGGCGGCATCGG	25	52	Platero et al., 2016
<i>nif</i> H-Cup R	Nitrogenase reductase	CCATCAGCAGATCTTCCAACCTGGTCC	26	53,85	Platero et al., 2016
BOX1A	Sequências de repetição no genoma	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	22	68,18	Versalovic et al., 1994

Para as amplificações de BOX-PCR, os DNAs moldes utilizados foram o DNA genômico extraído de cada isolado, na concentração de 20 ng/µL (VERSALOVIC, 1994). O sistema utilizado foi adaptado do protocolo original: 1,25 µl de dNTP (5 mmol/l), 0,75 µl de oligonucleotídeo iniciador BOXA1 (10 pmol/µl – Tabela 2), 2,5 µl de solução tampão 10x e 0,125 µl de GoTaq (5U/µl) (GoTaq® DNA Polymerase, Promega Corporation™), e 20,375 µl de água ultrapura para completar 25 µl. O programa no termociclador foi: desnaturação inicial (7 min a 95°C); 30 ciclos de desnaturação (30 s a 90°C), anelamento (1 min a 52°C), e extensão (8 min a 65°C); e extensão final (16 min a 65°C). Após as amplificações, 10 µL de produto de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% horizontal, 15x20 cm, numa corrente elétrica de 25 V por 16 horas. A amperagem manteve-se constante em 8 A. Ao final, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 60 min e fotografadas sob luz UV.

4.4.3 Purificação e sequenciamento do produto amplificado

O produto da amplificação do gene 16S rRNA foi purificado com o uso da reação enzimática simultânea de 0,33 µL de Exonuclease I (EXO I – 5,2 U/µL – Fermentas), 0,33 µL de FastAP (0,77 U/µL – Fermentas) e 0,34 µL de água ultrapura para um volume de 10 µL do material amplificado. Para ativação das enzimas, a reação foi incubada durante 60 min a 37 °C, seguido de inativação das enzimas a 85°C por 15 min.

O sequenciamento foi realizado a partir de 3,0 µl do material amplificado e purificado, 0,5 µl do iniciador de interesse (10 pmol), 2,5 µl de tampão Save Money (10% (v/v) com MgCl₂ 50 mM e 20% (v/v) de Tris-HCl pH 9,0), 1,0 µl de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e 3,0 µl de água ultrapura estéril para completar 10 µl de reação. A reação em termociclador foi realizada com o seguinte ciclo de temperaturas: desnaturação inicial (1 min a 96°C); 30 ciclos de desnaturação (15 s a 96°C), anelamento (15 s a 58°C), e extensão (3 min a 60°C); e extensão final (4 min a 60°C).

Ao término da reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados pela adição de 2 µl de acetato de amônio (7,5 M) e 10 µl de água ultrapura estéril, homogeneizado com a ponteira, 66 µl de etanol absoluto (Merck) e centrifugados por 45 minutos a 14.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e, logo após, adicionado 100 µl de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado novamente por 15 min a 14.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 37 °C por 2 horas.

Após secagem, o precipitado resultante foi ressuspenso em 3,0 µl de tampão de aplicação. As leituras de sequências foram obtidas em sequenciador automático Applied Biosystems® 3500 e 3500xL Genetic Analyzers.

4.4.4 Análise das sequências

As sequências obtidas dos isolados foram manipuladas pelo software Bioedit e comparadas contra o banco de dado “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)” do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997) para identificação taxonômica das bactérias.

Os dendrogramas de 16S rRNA/*recA*, *nifH* e *nodC* foram construídos a partir das sequências de DNA conseguidos após sequenciamento do genoma, e alinhadas no MEGA7 (KUMAR et al., 2016), e posteriormente, no mesmo software, usando a função de Filogenia, com o método *Neighbor-Joining* e *bootstrap* de 500.

4.4.5 Sequenciamento do DNA genômico

A partir do DNA extraído de bactérias selecionadas, foram construídas bibliotecas pareadas (2 x 250 bp) para sequenciamento usando o kit Nextera XT (Illumina) seguindo as recomendações do fabricante. Estas bibliotecas foram submetidas ao sequenciador MiSeq 500V2 (Illumina).

Os *contigs* obtidos foram montados e anotados de acordo com Cardoso (2015). Em seguida, os genomas foram depositados na plataforma *online* RAST (BRETTIN et al., 2015), com números de acesso de 518259 a 518266, para obtenção de sequências de genes de interesse como *recA*, *nifH* e *nodC*.

O Cálculo da Distância Entre Genomas (GGDC, do inglês *Genome-to-Genome Distance Calculator*) foi realizado pelo site <<http://www.ggdc.dsmz.de/>>, que consistiu na comparação entre dois genomas sequenciados, gerando um valor de similaridade DDH (Hibridização DNA-DNA, do inglês DNA-DNA *Hybridization*). Se a similaridade de DDH for acima de 70%, os dois genomas são considerados da mesma espécie. O contrário também é verdadeiro, se for abaixo de 70%, são considerados de espécies distintas (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

A Identidade Média de Nucleotídeos (ANI – do inglês *Average Nucleotide Identity*) foi calculada através do BLAST entre o genoma de interesse contra um ou

mais genomas de referência, pelo software *online* JSpecies (RICHTER et al., 2015). Os genomas de interesse estavam em arquivos no formato .FASTA, e os genomas referências estavam disponíveis *online*. Depois de submeter os genomas a comparação, o software gerou arquivos com os resultados através de porcentagens.

4.5 TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

4.5.1 Preparo das amostras

Com o intuito de auxiliar na identificação/diferenciação dos isolados, as bactérias foram submetidas à análise por espectrometria de massa MALDI-TOF. Inicialmente, foram cultivadas em placas de petri com meio YMA e crescidas em estufa a 28°C por dois dias. Uma colônia isolada foi selecionada e raspada e, em seguida, espalhada em um *spot* da placa de MALDI (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha) utilizando um palito estéril dentro do fluxo laminar.

Após esta etapa, foi adicionado 1 µl de matriz α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico (HCCA) sobre das células e deixado secar em temperatura ambiente. A matriz utilizada é composta de uma solução saturada contendo aproximadamente 10 mg/ml de HCCA em 100 µl de acetonitrila 100%, 95 µl de água ultrapura e 5 µl de ácido trifluoroacético 99% (STETS et al., 2013).

4.5.2 Análise das amostras na espectrometria de massa

Seguindo o protocolo de Stets et al. (2013), as amostras foram processadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF (Autoflex; Bruker Daltonics) equipado com um laser de nitrogênio, utilizando o software Flex Control v. 3.0 (Bruker Daltonics).

Os íons positivos foram extraídos usando uma voltagem de aceleração de 20 kV no modo linear. Cada espectro resultou da soma dos íons obtidos de 1.000 pulsos do laser com etapas de 100 em 100 pulsos em diferentes pontos da amostra.

A aquisição dos espectros foi realizada de forma manual com uma resolução entre 600 e 1200, e analisados em uma faixa de relação massa/carga (m/z) de 2.000 a 20.000, utilizando como calibrante a mistura de ACTH 1-24 (2.932 m/z), insulina (5.734,51 m/z), apomioglobina (16.952,27 m/z) (Protein Calibration Standard I – Bruker Daltonics). Os espectros obtidos foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

5 RESULTADOS

5.1 COLETAS DE *Mimosa* spp.

Foi amostrado um total de 26 espécimes de plantas no estado do Paraná e Santa Catarina, de maneira a representar dois tipos de vegetações e solos distintos encontrados nas seguintes regiões: Floresta Ombrófila Densa – Planície Litorânea (Paranaguá e Morretes/PR, Blumenau/SC), Serra do Mar (Piraquara/PR e Garuva/SC); e Floresta Ombrófila Mista (FOM) – 1º Planalto (Balsa Nova e Campo Magro) e 2º Planalto (Ponta Grossa, Porto Amazonas e Palmeira) (Figura 7). No total, foram identificadas 17 espécies de *Mimosa*, sendo 10 consideradas endêmicas do estado do Paraná (Tabela 3).

As plantas foram coletadas em altitudes variando desde o nível do mar até 1.538 m. Entretanto, as plantas foram encontradas mais frequentemente em altitudes elevadas, entre cerca de 800 m a 1.000 m, principalmente espécies consideradas endêmicas.

Um maior número de espécies de *Mimosa* foi coletado no 2º Planalto, com 7 espécies identificadas: *M. flocculosa*, *M. regnelli*, *M. scabrella*, *M. strobiliflora*, *M. dolens*, *M. dryandroides* e *M. lanata*, distribuídas entre os sítios de Ponta Grossa, Palmeira e Porto Amazonas. A média de altitude entre os sítios foi de 877 m, 973 m e 778 m do nível do mar, respectivamente, sendo um ponto de altitude intermediária a ser realizado coletas.

Na região da Serra do Mar, 5 espécies foram identificadas em Garuva (*M. hirsutula*, *M. murex*, *M. piscatorum*, *M. scabrella* e *Mimosa* sp.) e mais 2 em Piraquara (*M. congestifolia* e *M. pseudocallosa*), sendo coletadas em altitude média de 1.437 m, o ponto mais alto que se realizou coleta e de relevo montanhoso. Em Balsa Nova e Campo Magro foram encontradas 4 espécies: *M. dolens*, *M. gymnas*, *M. scabrella* e *Mimosa* spp. (2 exemplares). A altitude destes dois sítios também está acima de 1.000 m, mostrando uma rica diversidade. Como esperado, foi observado

que, durante as coletas, espécimes eram encontrados com maior frequência em altitudes elevadas.

Tabela 3. Relação de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. da região Sul do Brasil por sítios de amostragem.

Sítio	Hospedeiro	Isolados		
		Gênero ¹	Nº	% ²
São Luis do Purunã Balsa Nova – PR (1º Planalto)	<i>M. dolens</i>	S.I. ³	27	69,23
		<i>Pseudomonas</i>	9	23,08
		<i>Serratia</i>	3	7,69
	<i>M. gymnas</i>	<i>Rhizobium</i>	1	2,44
		<i>Agrobacterium</i>	3	7,32
		<i>Pseudomonas</i>	6	14,63
		<i>Oerskovia</i>	2	4,88
		<i>Arthrobacter</i>	4	9,76
		<i>Bacillus</i>	2	4,88
		<i>Brevibacterium</i>	1	2,44
		<i>Acinetobacter</i>	1	2,44
		<i>Microbacterium</i>	1	2,44
S.I. ³	20	48,78		
Blumenau – SC (Planície litorânea)	<i>M. pudica</i>	S.I. ³	32	100
Morro da Palha Campo Magro – PR (1º Planalto)	<i>M. scabrella</i>	S.I. ³	5	100
	<i>Mimosa</i> sp.2	S.I. ³	4	100
Campos do Quiriri Garuva – SC (Serra do Mar)	<i>M. hirsutula</i>	<i>Paraburkholderia</i>	18	100
		<i>M. murex</i>	<i>Paraburkholderia</i>	26
	<i>M. murex</i>	<i>Rhizobium</i>	8	21,05
		<i>Variovorax</i>	1	2,63
		<i>Sphingomonas</i>	1	2,63
		<i>Enterobacter</i>	1	2,63
		<i>Pseudomonas</i>	1	2,63
	<i>M. piscatorum</i>	<i>Paraburkholderia</i>	21	95,45
		S.I. ³	1	4,55
	<i>M. scabrella/lanata</i>	<i>Paraburkholderia</i>	2	12,50
		<i>Stenotrophomonas</i>	8	50
		<i>Paenibacillus</i>	2	12,50
		<i>Dyella</i>	1	6,25
		<i>Microbacterium</i>	1	6,25
		S.I. ³	2	12,50
<i>Mimosa</i> sp.3	<i>Paraburkholderia</i>	17	65,38	
	<i>Pseudomonas</i>	9	34,62	
Fazenda Gerds Morretes – PR (Planície litorânea)	<i>M. bimucronata</i>	<i>Enterobacter</i>	1	10
		Cedeceae	1	10
		S.I. ³	8	80
	<i>M. pudica</i>	<i>Paraburkholderia</i>	18	46,15

		<i>Cupriavidus</i>	10	25,64
		<i>Pseudomonas</i>	1	2,56
		<i>Herbaspirillum</i>	2	5,13
		<i>Serratia</i>	1	2,56
		S.I. ³	7	17,95
Recanto dos Papagaios Palmeira – PR (2º Planalto)	<i>M. dolens</i>	<i>Paenibacillus</i>	8	28,57
		<i>Bacillus</i>	3	10,71
		<i>Lysinibacillus</i>	1	3,57
		S.I. ³	16	57,14
	<i>M. dryandroides</i>	S.I. ³	25	83,33
		<i>Pseudomonas</i>	5	16,67
	<i>M. lanata</i>	<i>Pseudomonas</i>	3	12
		<i>Xanthomonas</i>	2	8
		S.I. ³	12	48
	<i>M. pilulifera</i>	<i>Pseudomonas</i>	1	12,50
S.I. ³		7	87,50	
Morro do Inglês Paranaguá – PR (Planície litorânea)	<i>M. pudica</i>	<i>Paraburkholderia</i>	11	68,75
		<i>Rhizobium</i>	4	25
		S.I. ³	1	6,25
Morro do Canal Piraquara – PR (Serra do Mar)	<i>M. congestifolia</i>	<i>Paraburkholderia</i>	29	46,03
		<i>Pseudomonas</i>	2	3,17
		S.I. ³	32	50,79
	<i>M. pseudocallosa</i>	<i>Paraburkholderia</i>	21	56,76
		<i>Paenibacillus</i>	1	40,54
		S.I. ³	15	2,70
Estrada da Embrapa Ponta Grossa – PR (2º Planalto)	<i>M. flocculosa</i>	<i>Pseudomonas</i>	3	37,50
		S.I. ³	5	62,50
	<i>M. regnelli</i>	<i>Paraburkholderia</i>	3	18,75
		<i>Pseudomonas</i>	1	26,25
		S.I. ³	2	12,50
	<i>M. paranapiacabae</i>	S.I. ³	8	100
Pontal do Sul Pontal do Paraná – PR (Planície litorânea)	<i>Machaerium stipitatum</i>	S.I. ³	2	100
	<i>Dalbergia ecastaphylla</i>	S.I. ³	8	100
Hidrelétrica Salto Caiacangá Porto Amazonas – PR (2º Planalto)	<i>M. scabrella</i>	S.I. ³	10	100
Rio Guaçu Porto Amazonas – PR (2º Planalto)	<i>M. strobiliflora</i>	S.I. ³	10	100

¹A identificação dos isolados foi obtida por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA; ²Porcentagem em relação ao total de isolados em cada planta hospedeira; ³S.I.: sem identificação.

Em contrapartida, os exemplares coletados em altitudes baixas, apresentavam poucos nódulos ou não apresentavam, como os de Morretes, Paranaguá e Blumenau. Nestes três sítios coletou-se *M. pudica*, já conhecida por ser cosmopolita, *M. bimucronata* em Morretes e *Machaerium stipitatum* (gênero relacionado) em Paranaguá.

Os laudos para análise físico-química dos solos estão apresentado no ANEXO 1 – Laudo de Análise de Solo. Os solos da planície litorânea são arenosos (Morretes e Paranaguá) e apresentam, naturalmente, alta salinidade (Pontal do Paraná), pois se encontram no litoral do estado; o solo da Serra do Mar foi coletado em área de Floresta Ombrófila Densa e é rico em matéria orgânica; o solo do Primeiro Planalto são antigos e de formação sedimentar (transição entre o 1º e 2º planaltos do Paraná).

O pH do solo em CaCl_2 é de uso preferencial por ser menos afetado pela concentração de eletrólitos do solo, e fornece uma medição mais consistente. Os valores de pH dos solos coletados variaram entre 4,20 na área de coleta do Recanto dos Papagaios (Palmeira/PR, amostra 4-C) e 6,60 na área de coleta da Estrada da Embrapa (Ponta Grossa/PR, amostra 9-K), ou seja, solos ácidos (ANEXO 1 – Laudo de Análise de Solo e APÊNDICE 4 – TABELA GERAL DE RESULTADOS DAS COLETAS).

Não foram realizadas medição para níveis de nitrogênio nas amostras de solos coletados (ANEXO 1 – Laudo de Análise de Solo). Entretanto, a bactéria do gênero *Cupriavidus* foi isolada de *Mimosa pudica* coletada da Fazenda Gerds (amostra 12-P). Sendo uma área de atividade agrícola, o solo pode estar suplementado com N, o qual pode ter ajudado na ascensão do *Cupriavidus* na simbiose, e conseqüentemente, seu isolamento.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

5.2.1 Identificação através de sequenciamento do gene 16S rRNA

No total, foram obtidos 541 isolados de bactérias. Os isolados, da coleta realizada em 2014, foram identificados pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, entre outros (Tabela 4). Não foram encontrados isolados do grupo dos beta-rizóbios, *Paraburkholderia* ou *Cupriavidus*. Estes gêneros encontrados possuem diversos representantes de bactérias associativas, muitas caracterizadas como fixadores de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal.

A partir da segunda coleta, em 2015, um total de 282 isolados foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Na Figura 8 é possível observar a distribuição dos gêneros dos isolados identificados em três filos: Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, com três classes de Proteobacteria identificadas: Alfaproteobactéria, Betaproteobactéria e Gamaproteobactéria.

A Tabela 4 lista o total de 22 gêneros e 50 espécies identificadas, sendo o gênero *Paraburkholderia* o mais encontrado, presente em 5 sítios de coleta (Ponta Grossa, Piraquara, Garuva, Morretes e Paranaguá). A espécie mais encontrada foi *Paraburkholderia mimosarum*, com 98 isolados (APÊNDICE 4 – TABELA GERAL DE RESULTADOS DAS COLETAS).

A Figura 9 mostra como os gêneros dos isolados identificados estão distribuídos em relação aos locais de coleta. O gênero dominante é *Paraburkholderia*, encontrado em todos os pontos de amostragem: Piraquara, Morretes e Paranaguá/PR, e Garuva/SC, seguidos de *Rhizobium*, identificado nas amostras de Paranaguá/PR e Garuva/SC. *Cupriavidus* foi encontrado somente na amostra de Morretes/PR, e *Pseudomonas*, não nodulantes, foi isolado em grande número nas amostras de Ponta Grossa/PR. A porção dos gráficos identificada como “Outros”, inclui mais de dois gêneros, com um baixo número de isolados

encontrados, que podem ser conferidos na Tabela 3. Estes dados levam a concluir que o gênero de simbiotes nodulantes de *Mimosa* spp. dominante nesta região é *Paraburkholderia*.

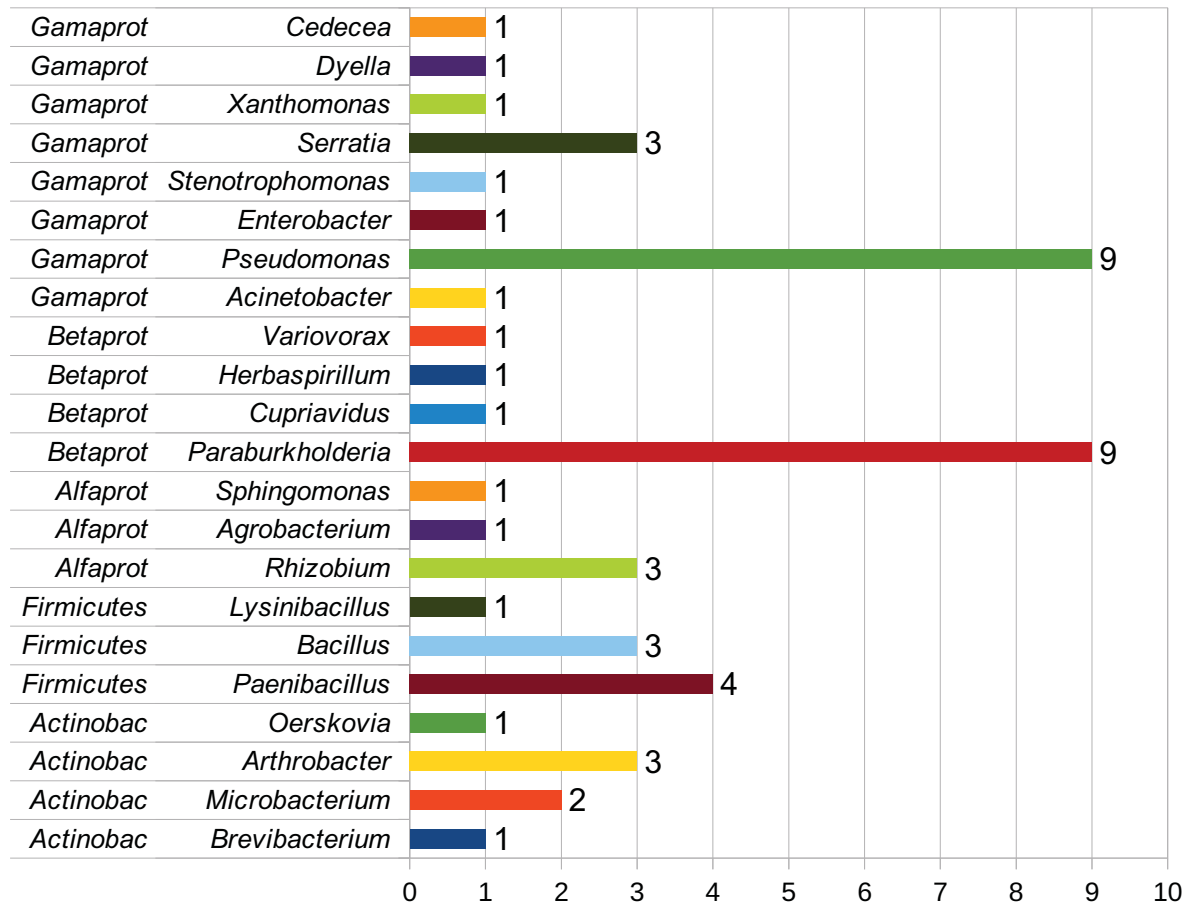


Figura 8. Número de espécies identificadas em cada gênero, e suas respectivas classes, através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os nomes iniciam-se pela classe, seguido do gênero. Os números ao lado de cada barra do gráfico representam a quantidade de espécies identificadas em cada gênero.

No ponto de coleta de Ponta Grossa/PR, foram encontrados quatro *Paraburkholderia* sp., em nódulos de *M. regnelli*, em meio a outros gêneros. Em Piraquara/PR, foi isolado majoritariamente *Paraburkholderia* sp. nos nódulos de *M. congestifolia* e *M. pseudocallosa*.

Em Morretes/PR, coletou-se *M. pudica* e foi isolado dos nódulos uma grande diversidade de bactérias, sendo a mais representativa *Paraburkholderia* sp., e também sendo encontrado isolados de *Cupriavidus* sp. e *Herbaspirillum* sp. Esta última bactéria nunca foi relatada como capaz de induzir a formação de nódulos em

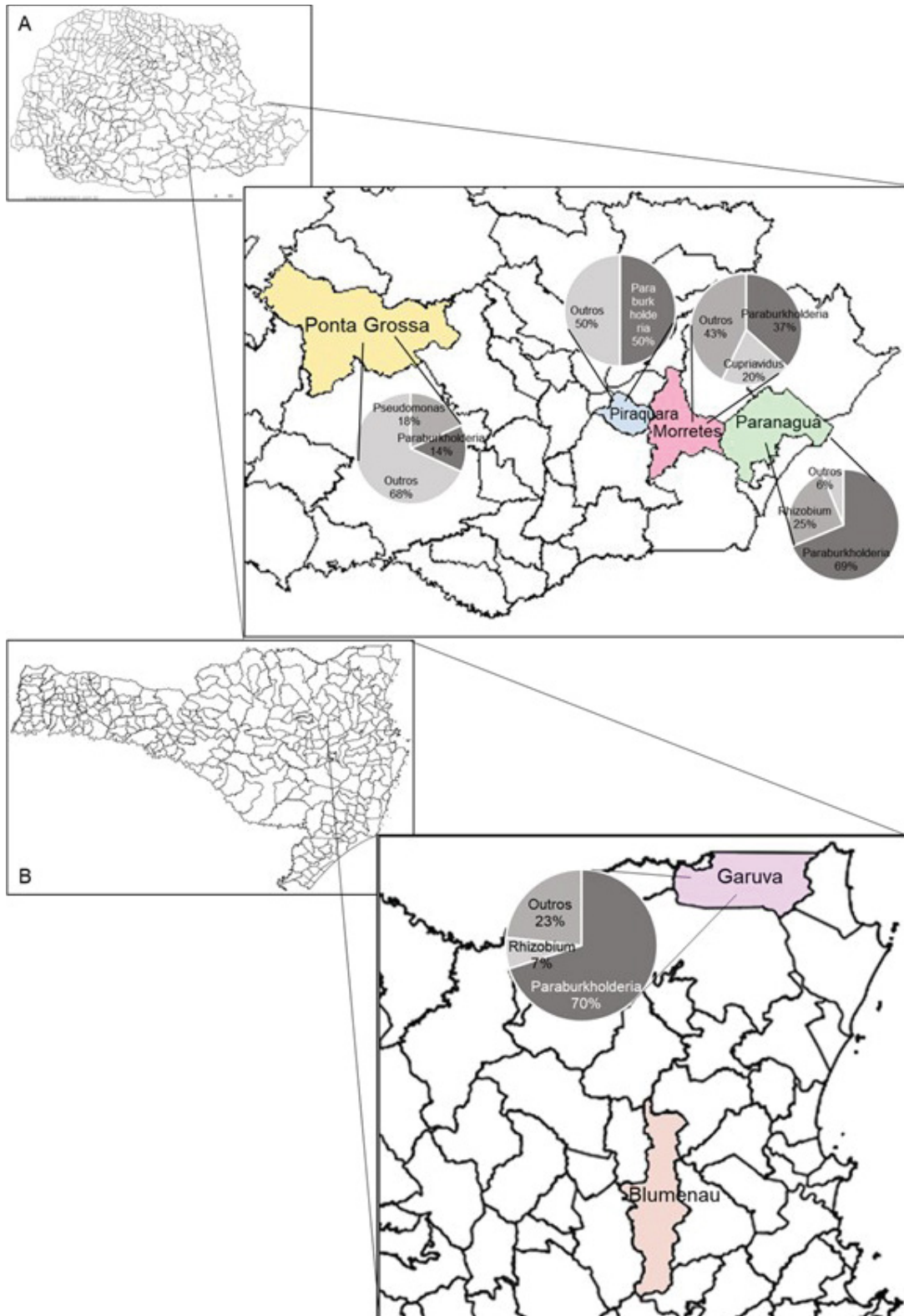


Figura 9. Distribuição relativa de gêneros de isolados de nódulos de *Mimosa* spp. no Sul do Brasil relativo às áreas de coleta.

(A) Mapa do estado do Paraná com as áreas de coleta em destaque.

(B) Mapa do estado de Santa Catarina com as áreas de coleta em destaque.

leguminosas e pode ter sido encontrada nos nódulos como oportunista. Já em Paranaguá/PR, *Paraburkholderia* sp. foram encontradas, juntamente ao isolado alfa-rizóbio *Rhizobium* sp., segundo simbiote mais frequente.

Em Garuva/SC, todos os espécimes de *Mimosa* coletadas (*M. hirsutula*, *M. murex*, *M. piscatorum*, *M. scabrella/lanata* e *Mimosa* sp.) apresentaram isolados de *Paraburkholderia* spp. *Mimosa hirsutula* continha em sua grande maioria *Paraburkholderia* sp.; *M. murex* continha a maior diversidade de bactérias nos nódulos, contendo todas as nove espécies de *Paraburkholderia* identificadas na Tabela 4, *Rhizobium* sp. (segundo simbiote), *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Variovorax* sp.; *M. piscatorum* apresentou a maioria de seus isolados identificados como *Paraburkholderia* sp.; *M. scabrella/lanata* apresentou a grande parte dos isolados identificados como *Stenotrophomonas* sp., sendo que também foram identificados *Paraburkholderia* sp. além de isolados não nodulantes, identificados em outros gêneros, como *Paenibacillus*, *Microbacterium* e *Dyella*; a espécime de *Mimosa* sp. deste local apresentou a *Paraburkholderia mimosarum* como principal simbiote, mas foi identificado também *Paraburkholderia* sp. e bactérias não nodulantes do gênero *Pseudomonas*.

O gênero *Cupriavidus*, um conhecido nodulante de *Mimosa* spp., foi encontrado em apenas uma amostra de *Mimosa pudica*, uma planta conhecidamente cosmopolita. O gênero *Rhizobium* pertence à classe das Alfaproteobactérias (alfa-rizóbios), mas já foram identificados como sendo capazes de nodular *Mimosa* spp.

O gênero *Pseudomonas* foi encontrado com frequência significativa. Outro gênero encontrado, possivelmente oportunista, foi *Herbaspirillum*, isolado da mesma espécime de *M. pudica* que foi isolado *Cupriavidus*. Assim como outros gêneros encontrados em menor frequência (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação aproximada das espécies de isolados de nódulos de *Mimosa* spp. da região Sul do Brasil a partir de sequências parciais do gene 16S rRNA.

Gênero do isolado	Nº de espécies	Espécie¹	Nº de isolados
<i>Paraburkholderia</i>	9	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	98
		<i>Paraburkholderia nodosa</i>	2
		<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	26
		<i>Paraburkholderia ferrariaeae</i>	9
		<i>Paraburkholderia humi</i>	4
		<i>Paraburkholderia oxyphila</i>	3
		<i>Paraburkholderia caribensis</i>	22
		<i>Paraburkholderia graminis</i>	1
		<i>Paraburkholderia terricola</i>	1
<i>Cupriavidus</i>	1	<i>Cupriavidus necator</i>	10
<i>Rhizobium</i>	3	<i>Rhizobium tropici</i>	4
		<i>Rhizobium jaguaris</i>	8
		<i>Rhizobium lusitanum</i>	1
<i>Agrobacterium</i>	1	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	3
<i>Acinetobacter</i>	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1
<i>Herbaspirillum</i>	1	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	2
<i>Pseudomonas</i>	9	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	7
		<i>Pseudomonas parafulva</i>	1
		<i>Pseudomonas protegens</i>	5
		<i>Pseudomonas endophytica</i>	1
		<i>Pseudomonas putida</i>	2
		<i>Pseudomonas koreensis</i>	1
		<i>Pseudomonas poae</i>	1
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
		<i>Pseudomonas baetica</i>	3
<i>Enterobacter</i>	1	<i>Enterobacter asburiae</i>	2
<i>Stenotrophomonas</i>	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8
<i>Serratia</i>	3	<i>Serratia</i> sp.	2
		<i>Serratia plymuthica</i>	1
		<i>Serratia proteamaculans</i>	1
<i>Brevibacterium</i>	1	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	1
<i>Microbacterium</i>	2	<i>Microbacterium asthrosphaerae</i>	1
		<i>Microbacterium azadirachtae</i>	1
<i>Xanthomonas</i>	1	<i>Xanthomonas theicola</i>	2
<i>Sphingomonas</i>	1	<i>Sphingomonas</i> sp.	1
<i>Dyella</i>	1	<i>Dyella terrae</i>	1
<i>Paenibacillus</i>	4	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	4

		<i>Paenibacillus castaneae</i>	1
		<i>Paenibacillus tundrae</i>	2
		<i>Paenibacillus pabuli</i>	4
<i>Bacillus</i>	3	<i>Bacillus simplex</i>	1
		<i>Bacillus megaterium</i>	3
		<i>Bacillus thuringiensis</i>	1
<i>Lysinibacillus</i>	1	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1
<i>Arthrobacter</i>	3	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	2
		<i>Arthrobacter aurescens</i>	1
		<i>Arthrobacter histidinovorans</i>	1
<i>Cedeceae</i>	1	<i>Cedeceae davisae</i>	1
<i>Oerskovia</i>	1	<i>Oerskovia turbata</i>	2
<i>Variovorax</i>	1	<i>Variovorax sp.</i>	1

¹Obtida através da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados contra o banco de dados “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea”, do NCBI, com o programa BLASTn; a identificação de cada espécie foi obtida a partir do primeiro resultado da busca com o programa BLASTn.

5.2.2 Classificação taxonômica dos isolados por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Dentre todos os 282 isolados identificados a partir da sequência parcial do gene 16S rRNA, foram geradas dendrogramas para pequenos grupos de isolados (Figura 10): um para o gênero *Paraburkholderia*, um para os gêneros *Cupriavidus/Herbaspirillum*, um para Alfabroteobactérias e um para Gamaproteobactérias. Nos dendrogramas também foram inclusos sequências de estirpes-referência pertencentes ao mesmo gênero de interesse, para melhor visualização de possíveis espécies entre os isolados.

O dendrograma A, das *Paraburkholderia sp.*, mostrou que os isolados são muito próximos uns dos outros. Em relação às estirpes-referência, a maioria é próxima de *Paraburkholderia mimosarum* HMP1 (localizada na parte inferior da árvore). Na parte central, é possível observar 3 isolados mais próximos de *Paraburkholderia nodosa* CNPSo1213. No topo do dendrograma, ficaram posicionados os isolados mais próximos de *Paraburkholderia phymatum* STM815.

O dendrograma B, dos gêneros *Cupriavidus/Herbaspirillum*, revelou que os isolados do gênero *Cupriavidus* tem proximidade com a estirpe-referência *Cupriavidus necator* ABIP260 e diferenciação de *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424. Assim como os isolados de *Herbaspirillum* que agruparam separadamente da referência *Herbaspirillum seropedicae* Z67.

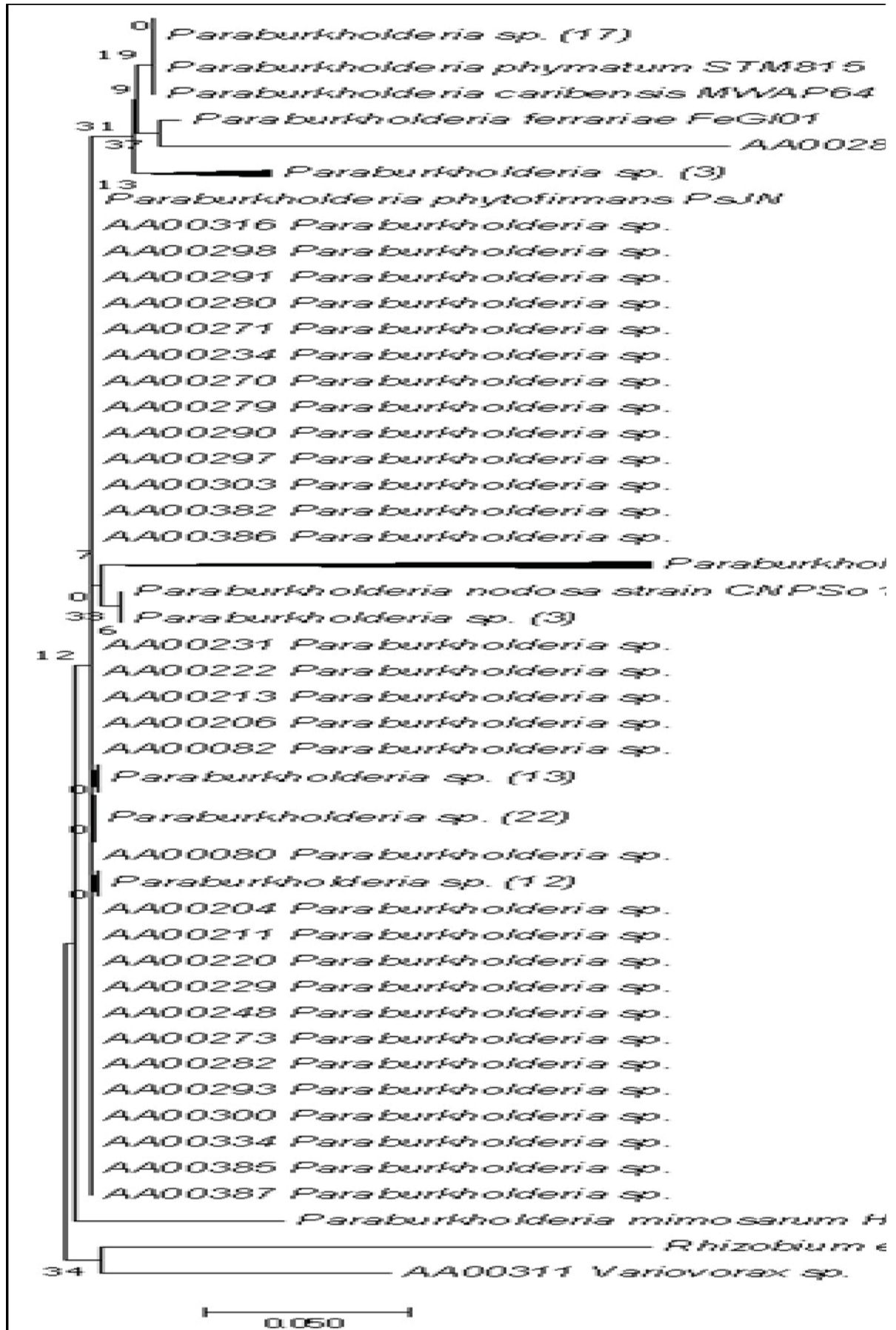
O dendrograma C, das Alfabroteobactérias, mostrou que a maioria dos isolados deste grupo são mais próximos de *Rhizobium lusitanum* P1-7. Abaixo, em seguida, 4 isolados revelaram proximidade com a estirpe-referência *Rhizobium tropici* CIAT899. As demais estirpes-referência não agruparam com nenhum isolado.

No dendrograma D, agrupam-se as Gamaproteobactérias, que inclui isolados de *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Serratia*, *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas*. A maioria dos isolados identificados como *Pseudomonas* não agruparam com as estirpes-referência *Pseudomonas endophytica* e *P. fluorescens*. Apenas 6 agruparam próximas de *Pseudomonas protegens* 58F4. Cinco isolados de *Stenotrophomonas* agruparam com a referência *S. maltophilia* KB2, e próximos de *Xanthomonas* sp.

Outros isolados identificados foram obtidos a partir de espécies particulares de *Mimosa* e locais específicos de coleta, como *Paenibacillus/Bacillus*, isolados de *M. dolens* em Balsa nova/PR (AA00052 e AA00054) e *M. scabrella* em Garuva/SC (AA00251 e AA00254); *Microbacterium*, isolado de *M. scabrella* em Garuva/SC (AA00250); e *Oerksovia* isolado de *M. gymnas* em Balsa Nova/PR (AA00025 e AA00042).

Figura 10. Árvore filogenética de isolados de nódulos de *Mimosa* spp. no Sul do Brasil, baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA dos isolados identificados.

A relação entre os isolados foi inferida usando o método *Neighbor-Joining*. A porcentagem de replicatas para o teste *bootstrap* (500 replicatas) é mostrada próximo aos ramos. As distâncias genéticas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood*. Todas as posições contendo *gaps* e dados perdidos foram eliminados. Os triângulos representam um sub-agrupamento reduzido com indivíduos similares, os números entre parênteses representam a quantidade de sequências utilizadas presentes nos triângulos. A sequência de referência foram retiradas do NCBI *Nucleotide*. (A) Árvore de isolados do gênero *Paraburkholderia* sp. (B) Árvore de isolados da classe Betaproteobactérias. (C) Árvore de isolados da classe Alfabroteobactérias. (D) Árvore de isolados da classe Gamaproteobactérias.



5.3 BOX-PCR

Após análises da identificação dos isolados, foram selecionadas um total de 36 bactérias para caracterização genotípica com resolução abaixo do nível de espécie e testes de nodulação, com o objetivo de remover a redundância genotípica destes isolados, e também para ter um número condizente de isolados para realização de testes posteriores. Estes 36 isolados foram escolhidos aleatoriamente das seguintes espécimes de plantas: *M. pudica* (16 isolados), *M. murex* (11 isolados), *M. hirsutula* (2 isolados), *M. scabrella/M. lanata* (1 isolado) e *Mimosa sp.* (2 isolados); de três regiões diferentes: Morretes (13 isolados), Garuva (16 isolados) e Paranaguá (3 isolados); e relacionados a 14 espécies de bactérias: *Cupriavidus sp.* (9 isolados), *Paraburkholderia sp.* (15 isolados), *Rhizobium sp.* (4 isolado), *Herbaspirillum sp.* (2 isolados), *Pseudomonas sp.* (1 isolado) e *Paenibacillus sp.* (1 isolado). A Tabela 5 apresenta o número de identificação de cada isolado.

O BOX-PCR foi conduzido com DNA genômico extraído destes isolados selecionados, porém, tiveram 4 isolados, para os quais a extração de DNA genômico não foi satisfatória por apresentarem muita produção de EPS, e cuja secreção impediu a boa execução do procedimento, e não foi possível a realização deste teste (AA00202 – *Paraburkholderia sp.*, AA00214 – *Paraburkholderia sp.*, AA00307 – *Rhizobium sp.*, e AA00350 – *Paraburkholderia sp.*).

Apesar dos padrões complexos verificados, foi possível agrupar os isolados em 18 padrões de amplificação BOX-PCR (Figura 11), identificados através das letras correspondentes na Tabela 5: 1 padrão para *Cupriavidus sp.* (9 isolados – linhas de 1 a 9); 2 padrões para *Paraburkholderia sp.* (linhas 10 e 11, e linhas 12 a 14); 1 padrão para *Rhizobium sp.* (2 isolados – linhas 15 e 16); 1 padrão para *Herbaspirillum sp.* (2 isolados – linhas 21 e 22); 13 padrões que não se repetiram entre os isolados restantes, relacionados a *Paraburkholderia sp.* (linhas 17, 19, 20, 25 e 27 a 31), *Rhizobium sp.* (linhas 26 e 32), *Paenibacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* (linhas 23 e 24, respectivamente) (Figura 11 - Tabela 5); e 1 padrão que degradou (linhas 18).

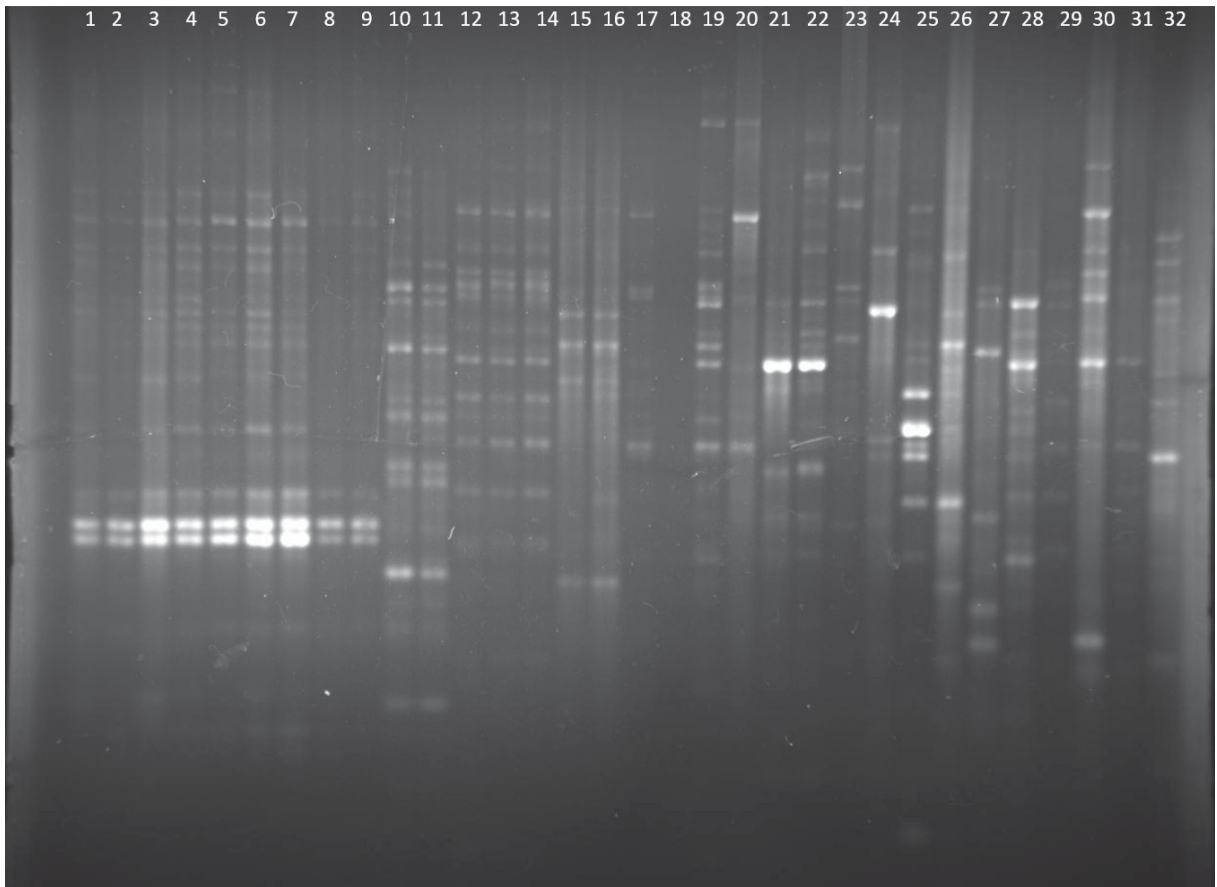


Figura 11. Padrões de amplificação de regiões de repetição BOX de isolados selecionados. Os grupos formados a partir dos padrões BOX-PCR e a numeração das linhas no gel, identificando cada isolado, estão de acordo com a tabela 5.

A partir deste resultado, pôde-se afunilar a seleção para 11 isolados, sendo escolhidos e destacados em negrito na Tabela 5: AA00356 (*Cupriavidus* sp.), AA00373 e AA00381 (*Paraburkholderia* sp.), AA00288 e AA00382 (*Paraburkholderia* sp.), AA00226 (*Paraburkholderia* sp.), AA00314 (*Paraburkholderia* sp.), AA00360 (*Herbaspirillum* sp.), AA00233 (*Paraburkholderia* sp.), AA00308 (*Rhizobium* sp.) e AA00380 (*Rhizobium* sp.).

Tabela 5. Grupos genotípicos BOX-PCR para isolados de nódulos de *Mimosa* spp. do Sul do Brasil.

Linha do gel ¹	ID isolado	ID 16S rRNA ²	Padrão de bandas ³
1	AA00374	<i>Cupriavidus necator</i>	A
2	AA00375	<i>Cupriavidus necator</i>	A
3	AA00376	<i>Cupriavidus necator</i>	A
4	AA00377	<i>Cupriavidus necator</i>	A
5	AA00378	<i>Cupriavidus necator</i>	A
6	AA00351	<i>Cupriavidus necator</i>	A
7	AA00356*	<i>Cupriavidus necator</i>	A
8	AA00358	<i>Cupriavidus necator</i>	A
9	AA00368	<i>Cupriavidus necator</i>	A
10	AA00359	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	C
11	AA00373*	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	C
12	AA00317	<i>Paraburkholderia nodosa</i>	B
13	AA00225	<i>Paraburkholderia nodosa</i>	B
14	AA00226*	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	B
15	AA00306	<i>Rhizobium jaguaris</i>	D
16	AA00308*	<i>Rhizobium jaguaris</i>	D
17	AA00288*	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	E
18	AA00315	<i>Paraburkholderia oxyphila</i>	E
19	AA00285	<i>Paraburkholderia ferrariae</i>	F
20	AA00314*	<i>Paraburkholderia ferrariae</i>	F
21	AA00355	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	G
22	AA00360*	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	G
23	AA00251	<i>Paenibacillus tundrae</i>	H
24	AA00242	<i>Pseudomonas endophytica</i>	I
25	AA00382*	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	J
26	AA00313	<i>Rhizobium jaguaris</i>	K
27	AA00381*	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	L
28	AA00270	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	M
29	AA00304	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	N
30	AA00232	<i>Paraburkholderia graminis</i>	O
31	AA00233*	<i>Paraburkholderia humi</i>	P
32	AA00380*	<i>Rhizobium tropici</i>	Q

¹ A numeração correspondem às linhas do gel mostrados na Figura 11.

² Identificação taxonômica obtida a partir da sequência parcial do gene 16S rRNA.

³ Cada letra representa um padrão de bandas único, obtido na análise BOX-PCR.

* Destaque em negrito: isolados selecionados para sequenciamento genômico.

5.4 TESTE DE NODULAÇÃO

Os mesmos isolados de nódulos de *Mimosa* spp. no Sul do Brasil, pré-selecionados para realizar o BOX-PCR, foram submetidos a testes de nodulação em vasos, usando como planta hospedeira *Mimosa pudica*, para comprovação da sua capacidade de induzir a formação de nódulos. Para verificar se os isolados tinham a capacidade de nodular, primeiramente foi realizado um ensaio de nodulação preliminar utilizando *Mimosa pudica* como planta hospedeira, para testar o protocolo. As sementes germinadas foram transplantadas em caixas-magenta com vermiculita estéril e regadas com solução Sarruge uma vez por semana. As bactérias foram crescidas em meio YMB e inoculadas 2 dias após a saída do cotilédone a superfície (Figura 12).

Os resultados são mostrados na Figura 14. Do total de 23 isolados testados, 15 (65%) obtiveram resultado positivo para o teste e 8 (35%), resultado negativo. Foi observada a formação de nódulos para os isolados AA00214, AA00233, AA00225, AA00270, AA00288, AA00304, AA00382, AA00285, AA00315, AA00350, AA00359 e AA00373 (*Paraburkholderia* sp.); AA00376, AA00377 e AA00378 (*Cupriavidus* sp.). E os resultados negativos foram AA00381 (*Paraburkholderia* sp.); AA00355 e AA00360 (*Herbaspirillum* sp.); AA00380 (*Rhizobium* sp.); AA00356, AA00358, AA00368 e AA00374 (*Cupriavidus* sp.). Não foram observados nódulos na planta não inoculada, usada como controle negativo.

Dentre os 13 isolados identificados no gênero *Paraburkholderia*, todos foram positivos para o teste de nodulação, exceto o isolado AA00381. Como esperado, os dois isolados identificados como *Herbaspirillum* não foram capazes de nodular a planta hospedeira. Entretanto, entre os 7 isolados identificados como *Cupriavidus*, 3 foram positivos e 4 negativos para o teste de nodulação. Também foi negativo para o teste de nodulação o único isolado identificado como *Rhizobium*.

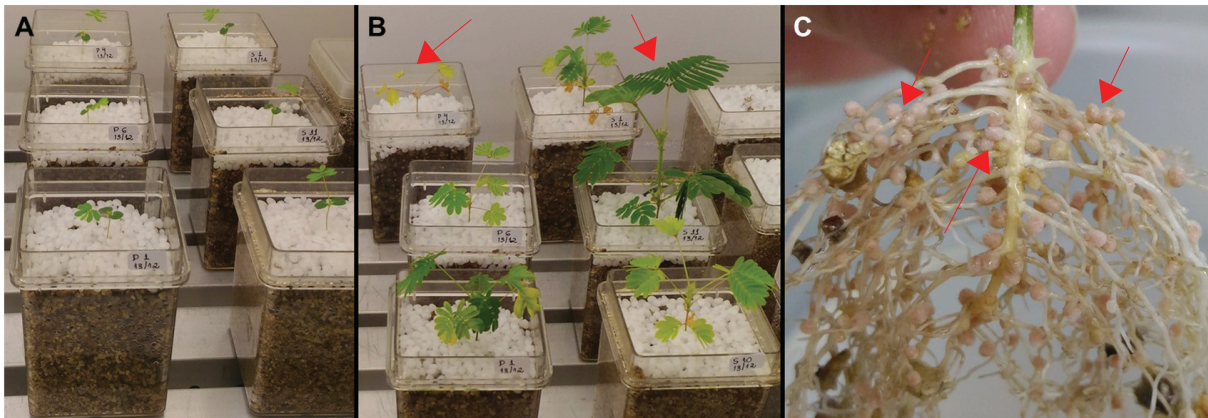


Figura 12. Ensaio preliminar de nodulação em *Mimosa pudica* inoculada com isolados de *Mimosa* spp. do estado do Paraná.

O ensaio foi realizado com isolados pré-selecionados por BOX-PCR.

(A) Plântulas recém-nascidas, com o cotilédone aparente;

(B) Plântulas em desenvolvimento por 30 dias após o inóculo. Setas vermelhas indicam as plantas com o menor e maior desenvolvimento após inoculação;

(C) Nódulos do isolado AA00382 (*Paraburkholderia* sp.) aderidos à raiz de *Mimosa pudica*. Alguns nódulos foram indicados pelas setas vermelhas. Sua cor rosácea indica a presença de leghemoglobinas, sugerindo atividade no nódulo e fixação de nitrogênio por parte do rizóbio.

É possível observar na Figura 12, que algumas plântulas se desenvolveram bem, apresentando bom crescimento e folhas verdes, enquanto outras apresentaram um desenvolvimento menor, sugerindo variação na eficiência da simbiose com as bactérias. Uma se destacou positivamente, a que foi inoculada com o isolado AA00382 (*Paraburkholderia* sp.); e outra que se destacou negativamente, a que foi inoculada com o isolado AA00374 (*Cupriavidus* sp.).

As bactérias inoculadas foram reisoladas utilizando o mesmo protocolo para o isolamento original, verificando se as raízes de cada plântula apresentavam nódulos. Quando houve presença de nódulos, eles foram coletados para o processamento das amostras (Figura 12). As identificações por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de todos os inóculos positivos confirmaram as identidades dos isolados inoculados.

Um segundo ensaio para nodulação foi realizado com 11 isolados selecionados, a partir dos resultados anteriores. O ensaio incluiu as estirpes-referência, *Paraburkholderia phymatum* STM815 (VANDAMME et al., 2002) e *Cupriavidus necator* LMG19424 (CHEN et al., 2001), usados como controles positivos, e os isolados AA00226, AA00233, AA00288, AA00306, AA00314, AA00356, AA00360, AA00373, AA00380, AA00381 e AA00382. Os ensaios foram

realizados em casa de vegetação, em vasos com três plântulas e uma bactéria inoculada por vaso (Figura 13).

As plantas foram cultivadas por 30 dias após a inoculação, quando foi realizada a verificação da presença ou ausência de nódulos nas raízes (Tabela 6). Algumas plântulas não cresceram, então a repetição tripla ficou defasada em alguns vasos. Os controles positivos, *Paraburkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus necator* LMG19424, formaram poucos nódulos nas raízes, aquém do esperado. O controle negativo (não inoculado) não teve contaminações e não formou nódulos.



Figura 13. Vasos com plântulas de *Mimosa pudica* inoculadas com isolados de nódulos de *Mimosa* spp. do Sul do Brasil.

As sementes germinadas foram depositadas em vermiculita estéril, a rega foi feita uma vez por semana com solução Sarruge. A coleta foi feita depois de 30 dias do inóculo.

Na Tabela 6 estão resumidos os resultados para o ensaio, e na Figura 14 são mostrados vasos com plantas após 30 dias de inoculação. Os resultados positivos para nodulação foram observados para inoculação com 9 dos isolados: AA00214, AA00226, AA00233, AA00288, AA00314, AA00382, AA00373

(*Paraburkholderia* sp.); e AA00356 e AA00374 (*Cupriavidus* sp.). A maioria dos testes confirmaram os resultados obtidos no primeiro ensaio de nodulação. Entretanto, os isolados AA00356 e AA00374 mostraram resultados positivos para o segundo ensaio de nodulação, mas resultados negativos no primeiro ensaio. Ambos os isolados foram identificados como *Cupriavidus*. Os demais resultados positivos, confirmados nos primeiro e segundo ensaios, continham isolados identificados como *Paraburkholderia*.

Resultados negativos para nodulação foram confirmados para outros 4 isolados testados: um isolado identificado como *Paraburkholderia* (AA00381) e três isolados identificados como *Rhizobium* (AA00306, AA00360 e AA00380). A maior parte dos isolados testados, 7 (54%), foram originalmente isolados de *M. pudica*, entretanto, 3 destes isolados não foram capazes de induzir nódulos nas raízes das plantas, identificados como *Rhizobium*, *Herbaspirillum* e *Paraburkholderia*. Uma bactéria, originalmente isolada de *M. murex* e identificada como *Rhizobium*, também não foi capaz de formar nódulo em *M. pudica*. Outros 3 isolados originais de *M. murex*, 1 de *M. piscatorum* e 1 de *Mimosa* sp. foram capazes de nodular *M. pudica* nos ensaios.

Os nódulos foram coletados das raízes e submetidos ao protocolo para isolamento do rizóbio. Após o crescimento dos reisolados, foi observado que só havia um tipo morfológico de colônia, o que indicou não haver contaminação cruzada. Três colônias reisoladas foram submetidas a amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, para confirmar sua identidade taxonômica.

Os isolados AA00214 e AA00226 formaram nódulos que apresentaram cores rosa a roxo, tendo sido isoladas de espécies de *Mimosa* diferentes (*M. piscatorum* e *M. murex*). No reisolamento, as bactérias recuperadas tiveram a identificação confirmada para *Paraburkholderia* sp. em relação ao inóculo. O isolado AA00233, de *Mimosa murex*, obteve um resultado positivo para nodulação em *M. pudica* no primeiro e segundo ensaio. A identificação do reisolado através da sequência parcial do gene 16S rRNA foi para *Paraburkholderia* sp. Assim como, para quatro isolados (AA00288, AA00314, AA00382, AA00373) foram testados e confirmados através de

Tabela 6. Ensaio de nodulação em *Mimosa pudica* com os isolados de nódulos de *Mimosa* spp. no Sul do Brasil.

Isolado	Isolamento (planta nativa)		Re-isolamento (<i>Mimosa pudica</i>)		
	Hospedeiro nativo	ID 16S rRNA ¹	ID 16S rRNA ²	Segundo teste	Primeiro teste
STM815 ³ (controle)	<i>Aspalathus carcosa</i>	<i>Paraburkholderia phymatum</i>	<i>Paraburkholderia phymatum</i>	++	NT
LMG19424 ⁴ (controle)	<i>M. pudica</i>	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	++	NT
AA00214 ⁵	<i>M. piscatorum</i>	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	++	NT
AA00226 ⁵	<i>M. murex</i>	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	+	NT
AA00233 ⁵ (G)	<i>M. murex</i>	<i>Paraburkholderia humi</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	++	+
AA00288 ⁵ (G)	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	++	+
AA00314 ⁵ (G)	<i>M. murex</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	<i>Paraburkholderia phymatum</i>	+++	NT
AA00382 ⁵ (G)	<i>M. pudica</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	+	+
AA00373 ⁵ (G)	<i>M. pudica</i>	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	+	+
AA00381 ⁵ (G)	<i>M. pudica</i>	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	Não nodulou	-	-
AA00356 ⁵	<i>M. pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	++	-
AA00374 ⁵	<i>M. pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	+++	-
AA00306 ⁵	<i>M. murex</i>	<i>Rhizobium jaguaris</i>	Não nodulou	-	NT
AA00380 ⁵ (G)	<i>M. pudica</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	Não nodulou	--	-
AA00360 ⁵ (G)	<i>M. pudica</i>	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	Não nodulou	---	-

¹ O nome da espécie mostrado foi obtido a partir do primeiro resultado de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA para identificação do isolado;

² Nome da espécie do reisolado obtido a partir de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;

³ Vandamme et al. (2002);

⁴ Chen et al. (2001);

⁵ Este estudo;

(G) isolados para os quais foi realizado o sequenciamento genômico;

(+) uma plântula desenvolvida e com nódulos;

(++) duas plântulas desenvolvidas e com nódulos;

(+++) três plântulas desenvolvidas e com nódulos;

(-) raiz sem nódulos;

(NT) isolado não testado.

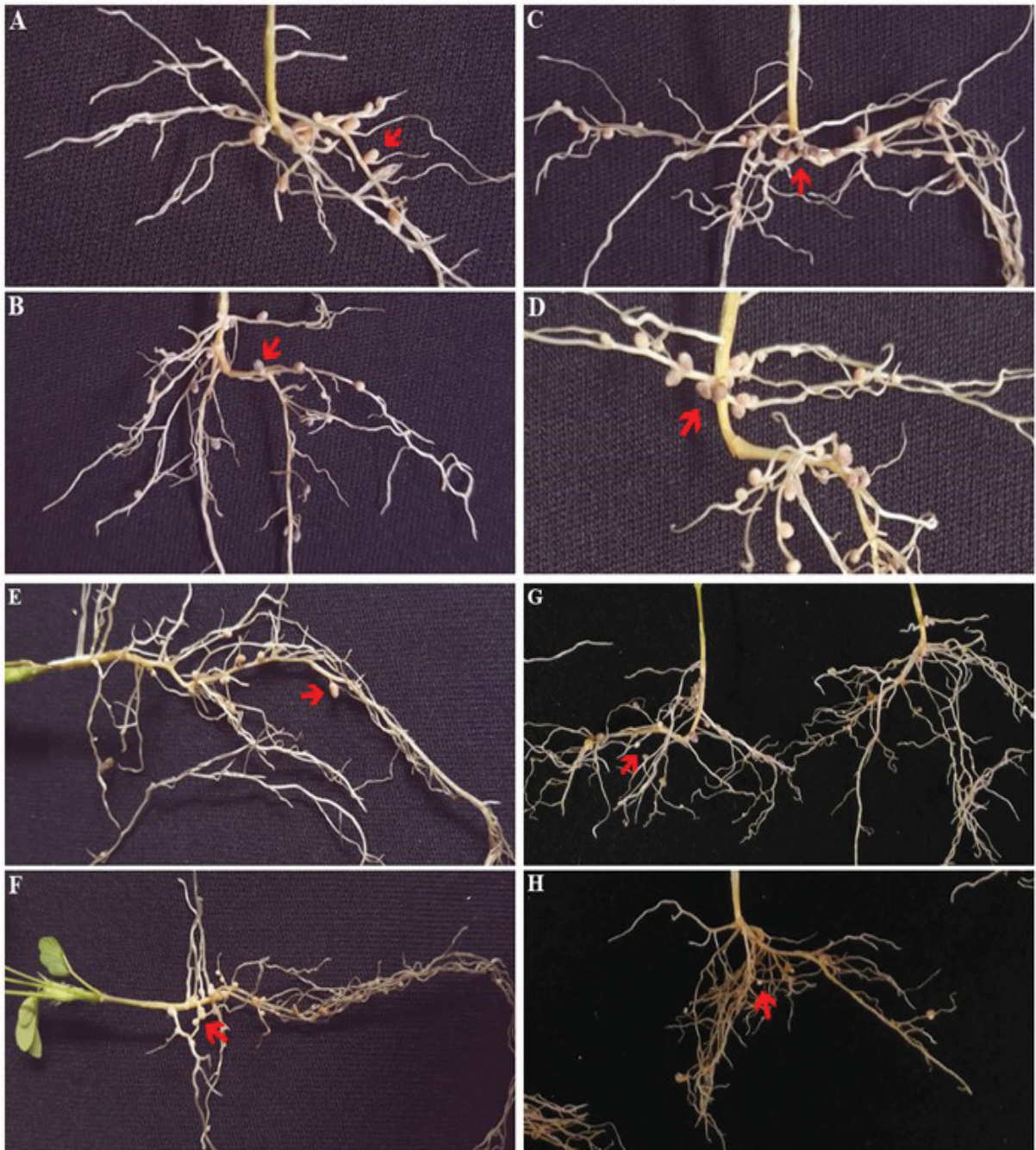


Figura 14. Ensaio de nodulação em *Mimosa pudica* para isolados de nódulos de *Mimosa* spp. do Sul do Brasil.

Raízes de *M. pudica* com resultado positivo para nodulação. Os nódulos estão anexados ao longo das raízes. (A) *Cupriavidus necator* (AA00356); (B) *Paraburkholderia phytofirmans* (AA00214); (C) *Paraburkholderia phytofirmans* (AA00226); (D) *Paraburkholderia mimosarum* (AA00288); (E) *Paraburkholderia humi* (AA00233); (F) *Paraburkholderia caribensis* (AA00373); (G) *Cupriavidus necator* (AA00374); (H) *Paraburkholderia mimosarum* (AA00314).

identificação dos reisolados. Dos inóculos de *Paraburkholderia* sp., apenas AA00381 não teve resultado positivo. Uma hipótese é que podem ser de estirpes diferentes, uma contendo os genes *nod* e outra não, já que foram isoladas de locais

diferentes. Contudo, para comprovar, são necessários mais experimentos de nodulação e de amplificação dos genes *nod*.

Os dois isolados identificados como *Cupriavidus* sp. apresentaram resultado negativo para o primeiro ensaio de nodulação. Porém, no segundo ensaio de nodulação, estes isolados nodularam as raízes de *M. pudica*, como esperado. Suas identificações por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foram confirmadas em relação ao inoculado.

O resultado da atividade de nodulação para os dois *Rhizobium* sp. foram negativos, ao contrário do esperado, já que o gênero *Rhizobium* também possui vários representantes comprovadamente capazes de nodular de *Mimosa* spp. sendo, sendo em algumas regiões, predominante em relação ao gênero *Paraburkholderia*.

O isolado AA00360, identificado como *Herbaspirillum* sp., mostrou resultado negativo para nodulação em *M. pudica*, indicando que pode ter sido identificado nos nódulos de *Mimosa* spp. como uma possível bactéria oportunística, já que este gênero contém bactérias endofíticas associadas a diversas plantas.

5.5 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

5.5.1 Caracterização dos Isolados

A identificação de bactérias ambientais é um grande desafio já que a proporção de bactérias desconhecidas e não-cultiváveis é muito alta, e existem inúmeros nichos, tais como solo e rizosfera de plantas. A identificação de microrganismos por espectrometria de massa tem sido usada em bactérias isoladas de diversos ambientes, mas enfrenta problemas na identificação taxonômica, uma vez que os bancos de dados de espectros de estirpes referência são mais

representativos para microrganismos clínicos e pouco representativos para microrganismos ambientais (STETS et al., 2013).

Estes fatores fazem com que a identificação taxonômica de bactérias ambientais por espectrometria de massa de células inteiras seja dificultada. Contudo, o agrupamento hierárquico de espectros de isolados constitutivos é uma alternativa para a identificação de isolados ambientais relacionados e eliminação de redundância (STETS et al., 2013), podendo ser utilizada para direcionar o sequenciamento de genes marcadores, como 16S rRNA.

Os isolados de nódulos de raízes de *Mimosa* spp. também foram submetidos a identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF. Os espectros MSP foram submetidos à comparação contra o banco de dados da Bruker (contendo aproximadamente 7.000 estirpes referência), para identificação taxonômica. Todavia, por limitações de ordem técnica, o *software* não se comportou da maneira esperada, entrando em conflito e não exibindo resultados todas as vezes, que a análise de todos os isolados foi solicitado.

Um total de 331 isolados (com identificadores de AA00214 a AA00544) foram caracterizados por espectrometria de massa, sendo que, deste conjunto, 207 isolados tiveram também o gene 16S rRNA parcialmente amplificado e sequenciado (com identificadores de AA00214 a AA00420), sendo usados como referência para os grupos taxonômicos obtidos na análise de agrupamento.

Então, numa primeira comparação entre os próprios isolados, realizada entre os MSPs dos isolados identificados (de AA00214 a AA00420) contra os não identificados (de AA00421 a AA00544), demonstrados no APÊNDICE 1 – Classificação: Isolados Identificados X não Identificados. Observou-se que os isolados não identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (AA00422 a AA00435) têm muita semelhança com os isolados identificados oriundos da mesma área de coleta (Morro do Canal, em Piraquara/PR).

A identificação de novos isolados foi possível a partir do agrupamento dos espectros e proximidade com aqueles isolados identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA: 23 isolados agruparam com isolados de *Paraburkholderia mimosarum*, 4 isolados agruparam com isolados de

Paraburkholderia phytofirmans, e 1 isolado (AA00495) agrupou com isolado AA00242 – *Pseudomonas endophytica* (ANEXO 2 e APÊNDICE 1, 2 e 3).

No ANEXO 2, há a legenda dos símbolos mostrados nas tabelas do APÊNDICE 1, 2 e 3. Os valores de score são representados por símbolos: (+++) assegura que as amostras têm alta probabilidade de serem da mesma espécie; (++) assegura que as amostras são do mesmo gênero; (+) significa provável identificação de gênero; (-) significa sem identificação. A consistência de categorias é representada por letras: (A) consistência de espécie, assegura que são, pelo menos, da mesma espécie; (B) consistência de gênero, assegura que são, pelo menos, do mesmo gênero; (C) sem consistência, nem espécie nem gêneros são iguais. Contudo, para gerar esta análise, os isolados foram mantidos com a nomenclatura usual de trabalho na bancada, por alguns isolados ainda não terem sua espécie identificada.

Numa segunda comparação, foi possível verificar, que, em geral, os isolados de Blumenau/SC não se misturaram aos isolados do Paraná (Figura 15). O isolado BNU2.1 encontra-se junto ao segundo agrupamento, contendo também isolados, identificados por sequenciamento, de *Rhizobium* sp., sugerindo, desta maneira, ser um representante de alfa-rizóbio. No quarto agrupamento (ramos na cor verde na Figura 15) os isolados possuem uma característica em comum, a produção de EPS. Alguns destes isolados (BNU.5A, BNU.4A, BNU.3A e BNU.2A) formam um sub-agrupamento com muita proximidade a isolados identificados como *Paraburkholderia caribensis*. No sexto agrupamento (ramos em azul claro na Figura 15), se encontra um pequeno sub-agrupamento, incluindo dois isolados identificados como *Paraburkholderia mimosarum*, próximo a outro sub-agrupamento, também contendo isolados identificados como *Paraburkholderia mimosarum*.

Existem alguns estudos que utilizaram a técnica de identificação de isolados ambientais por espectrometria de massa de células inteiras MALDI-TOF. Ferreira et al. (2011) gerou espectros-referência de estirpes de *Rhizobium*, *Ensifer* e *Shinella*, arizóbios de crescimento rápido, cultivados em dois meios de cultivo: o YMA e o TY. Entretanto, foi verificado que os espectros dos isolados crescido em meio TY tinham picos mais definidos e com score alto. Já os isolados crescidos em meio YMA obtiveram picos com ruídos e com baixo score devido à alta produção de EPS,

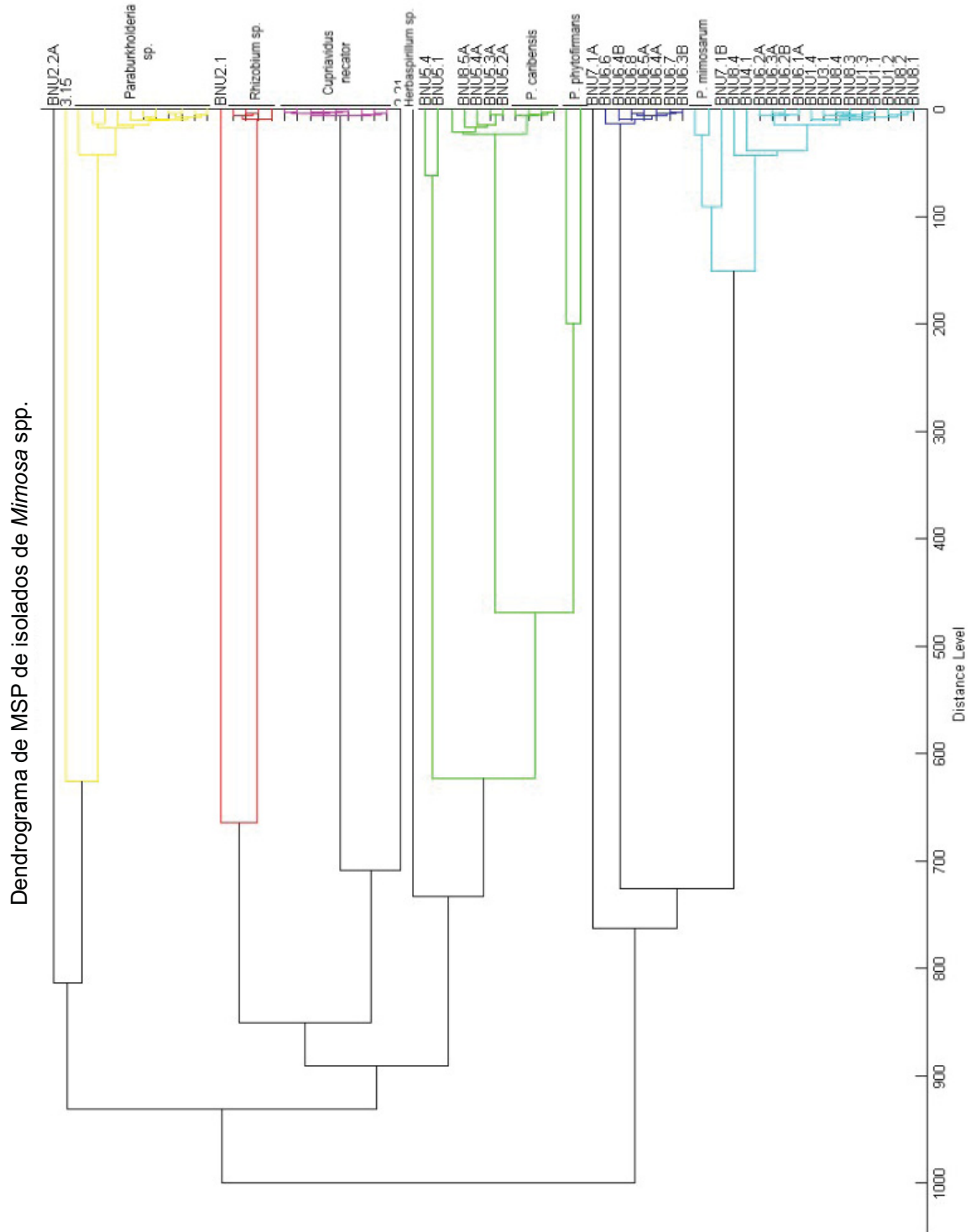


Figura 15. Dendrograma baseado em espectros de massa MALDI-TOF MS de células inteiras entre isolados identificados X isolados não identificados de SC.

Isolados de nódulos de *Mimosa* spp., amostradas no estado do Paraná, foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e os agrupamentos estão identificados com os nomes para as respectivas espécies. Isolados com prefixo com a nomenclatura iniciada com "BNU" foram obtidos de nódulos de *M. pudica*, amostradas em Blumenau/SC, e não foram identificados por sequenciamento.

que atrapalha no preparo da amostra para análise no MALDI-TOF MS. Por fim, Ferreira concluiu que a identificação pelo método MALDI-TOF MS é confiável e comparável a análises de sequências de genes *housekeeping*, conseguindo discriminar estirpes com o gene *rrs* idêntico e *recA* e *atpD* divergentes.

Além do uso da técnica para identificação de isolados de ambientes naturais, Ziegler et al. (2012) gerou espectros-referência de MALDI-TOF MS de estirpes de rizóbios *Bradyrhizobium japonicum* G49, *Sinorhizobium fredii* NGR234 e *Sinorhizobium fredii* USDA257, para facilitar a identificação de bactérias que foram re-inoculadas em três leguminosas: *Glycine max*, *Macroptilium atropurpureum* e *Vigna unguiculata*. A clusterização dos isolados foi devidamente posicionada junto às suas estirpes-referência, formando três sub-agrupamentos referentes às três plantas hospedeiras das quais foram isoladas.

Levando em consideração que, os isolados com produção de EPS ficaram em um agrupamento separado de outras *Paraburkholderia* (Figura 15), o EPS pode ter interferido na aquisição dos espectros e no posicionamento dos isolados, identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA como *Paraburkholderia phytofirmans* e *Paraburkholderia caribensis*. Contudo, manteve próximo os isolados de fenótipos iguais.

Os mesmos 36 isolados, utilizados para o BOX-PCR, foram também submetidos a identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF, incluindo mais duas estirpes-referência: *Paraburkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424. Os MSP obtidos foram submetidos à comparação contra o banco de dados da Bruker, para possível identificação taxonômica.

Na primeira comparação dos MSPs dos isolados contra o banco de dados do Biotyper, possibilitou a identificação em nível de espécie para 4 isolados como *Paraburkholderia caribensis* (AA00317, AA00350, AA00357 e AA00359); 1 isolado (AA00355) como *Herbaspirillum huttiense*; 2 isolados (AA00358 e AA00351) como *Cupriavidus necator*; e 1 isolado (AA00251) como *Paenibacillus pabuli*. A identificação em nível de gênero também foi possível para 1 isolado (AA00242)

como *Pseudomonas*; 2 isolados (AA00356 e AA00378) como *Cupriavidus*; 1 isolado (AA00381) como *Burkholderia*; e 1 isolado (AA00214) como *Burkholderia*. Estes dados estão demonstrados no APÊNDICE 2 – Classificação: Isolados X Banco de Dados Biotyper. A legenda explicativa de cores e scores estão disponíveis no ANEXO 2.

Os 23 isolados restantes não obtiveram score mínimo necessário para sua identificação. O banco de dados da Bruker contém padrão de espectros de massa para mais de 7 mil estirpes-referência de bactérias. Entretanto, possui maior representatividade para estirpes de interesse clínico, dificultando a identificação de isolados ambientais.

Na segunda comparação realizada, os MSPs de todos isolados foram comparados contra os MSPs gerados para as estirpes referência *Paraburkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 (APÊNDICE 3 – Classificação: Isolados X *Paraburkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424). O resultado apenas identificou 2 isolados como *Cupriavidus* (AA00351 e AA00356), indicados pela seta ao lado dos nomes, em nível de confiabilidade para identificação de gênero. Ou seja, segundo as análises de colônias em MALDI-TOF MS, não houve isolados identificados para as espécies *Paraburkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424.

Em seguida, um dendrograma contendo os espectros de massa consensos (MSP) dos 36 isolados, mais as duas estirpes referência, foi gerado (Figura 16). No primeiro agrupamento, em verde na figura, foram agrupados todos os isolados da classe Alfabroteobactéria, identificados como *Rhizobium* sp., referindo-se ao isolado AA00380 de *M. pudica*, e aos demais isolados de *M. murex*. A análise por BOX-PCR apresentou padrões diversificados para este agrupamento, e apenas os isolados AA00306 e AA00308 mostraram mesmo padrão.

O segundo agrupamento, em amarelo na figura, foi o que exibiu maior diversidade de isolados identificados como *Paraburkholderia* sp., oriundos de plantas diferentes: *M. pudica*, *M. murex*, *M. scabrella*, *M. hirsutula*. Os padrões de BOX-PCR também diversificaram para alguns isolados de mesmo nome (identificado por 16S rRNA), por ex., *P. mimosarum* (AA00270, AA00288, AA00304, AA00314,

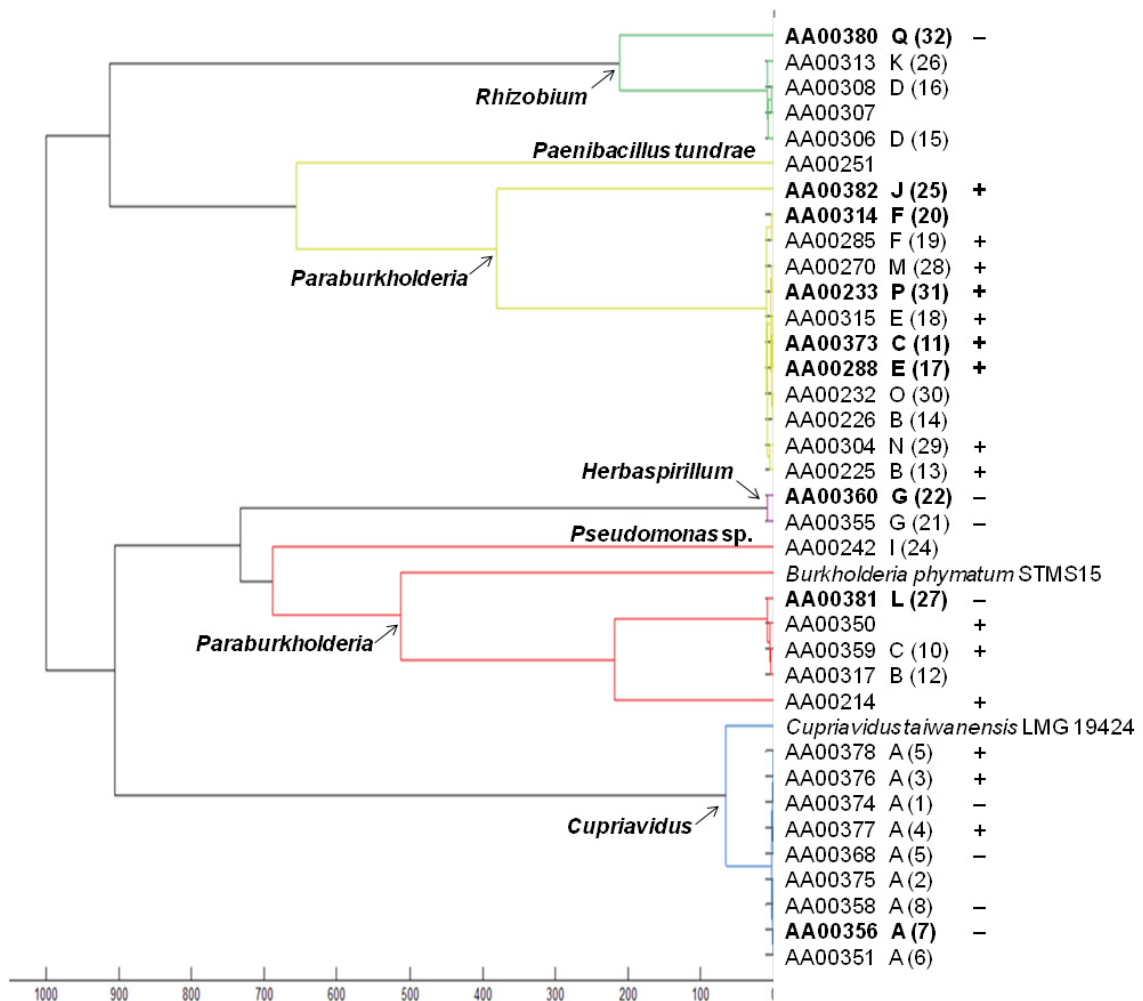


Figura 16. Dendrograma gerado a partir de espectros de massa MALDI-TOF obtidos de isolados de nódulos de *Mimosa* spp., coletados no Sul do Brasil.

Espectros de massa consensos (MSP) foram obtidos a partir de três espectros para cada isolado, no software MALDI Biotyper 3.1 (Bruker). Foi adicionado a análise, espectros de estirpes-referência: *Paraburkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424. É mostrado a identificação para cada isolado e, quando disponível, seguido do grupo genotípico BOX-PCR (letras de A-Q) com o número correspondente à linha no gel entre parênteses (Figura 11), seguido do resultado de teste de nodulação preliminar (+) isolado nodulante ou (-) isolado não-nodulante, (ausente) não testado. Isolados que tiveram seu genoma sequenciado são mostrados em negrito; a identificação taxonômica de gênero mostrada foi obtida a partir da sequência parcial do gene 16S rRNA.

AA00382). Já a *P. ferrariae* (AA00285) está localizada no mesmo sub-agrupamento e teve mesmo padrão molecular de amplificação por BOX-PCR.

O agrupamento roxo, com 2 isolados (AA00355 e AA00360) foram identificados como *Herbaspirillum frisingense* pelo sequenciamento, mostraram um mesmo padrão de amplificação BOX-PCR. O agrupamento vermelho contém isolados identificados dentro do gênero *Paraburkholderia* (Betaproteobactéria) como

P. caribensis, e AA00214 como *P. phytofirmans*, possuindo neste seguimento similaridades com a estirpe de referência *P. phymatum* STM815, tanto molecularmente quanto morfológicamente, pois eles apresentam grande produção de EPS. O isolado AA00242 foi identificado como *Pseudomonas endophytica* (Gamaproteobactéria).

O agrupamento azul inclui somente isolados identificados como *Cupriavidus necator* (Betaproteobactéria), mostrando similaridade com a estirpe referência *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424. Estes dados estão de acordo com os padrões BOX-PCR obtidos, onde os isolados apresentaram o mesmo padrão de amplificação.

Apesar da técnica de identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF ser bastante eficiente, neste caso ela não auxiliou na seleção dos isolados. O software Biotyper 3.1 gerou os dendrogramas em arquivo de extensão .jpeg automaticamente, e não foi possível realizar a edição da imagem de forma a manter a resolução ótima para ajustar o comprimento dos braços, para melhor análise das amostras, principalmente o segundo agrupamento com vários isolados do gênero *Paraburkholderia*.

De forma geral, os grupos formados a partir dos padrões genotípicos BOX-PCR foram agrupados coerentemente com os grupos fenotípicos obtidos na análise de espectrometria de massa. Exceção ocorreu para os isolados incluídos no gênero *Paraburkholderia*, que formaram dois grupos distintos. Já foi anteriormente reportado que a análise de agrupamento a partir de espectros de massa de células inteiras é capaz de agrupar corretamente grupos taxonômicos muito próximos, mas não mantém a relação taxonômica correta em níveis mais altos (STETS et al., 2013). Entretanto, os isolados AA00317 e AA0359 foram incluídos em agrupamento diferente de outros isolados com os mesmos padrões genotípicos BOX-PCR **B** e **C**, respectivamente.

Por fim, 24 isolados foram escolhidos pelo critério de diversidade genotípica/fenotípica apresentada nas análises de BOX-PCR e espectrometria de massa MALDI-TOF, respectivamente, para teste de nodulação e/ou sequenciamento genômico, sendo eles: AA00204, AA00214, AA00225, AA00233, AA00270, AA00285,

AA00288, AA00314, AA00315, AA00350, AA00359, AA00373, AA00381 e AA00382 (*Paraburkholderia*); AA00356, AA00358, AA00368, AA00374, AA00376, AA00377 e AA00378 (*Cupriavidus*); AA00355 e AA00360 (*Herbaspirillum*); AA00380 (*Rhizobium*). Até o presente momento, os isolados que tiveram seus genomas sequenciados foram: AA00233, AA00288, AA00314, AA00373, AA00381, AA00382 (*Paraburkholderia* sp.), AA00356 (*Cupriavidus* sp.), AA00360 (*Herbaspirillum* sp.) e AA00380 (*Rhizobium* sp.).

5.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE GENÔMICA

Dentre os isolados caracterizados por BOX-PCR, dez foram selecionados de acordo com os padrões obtidos, para sequenciamento genômico. O conjunto de leituras de sequências para cada isolado foi submetido a uma montagem *de novo* automática e o rascunho genômico foi submetido a anotação automática no sistema RAST 2.0 (*Rapid Annotation Using Subsystem Technology* – BRETTIN et al., 2015; OVERBEEK et al., 2014; AZIZ et al., 2008). Na Tabela 7 foram compilados os resultados obtidos para montagem e anotação de cada genoma, e foi verificado que o maior do genoma estimado é de AA00356 (*Cupriavidus* sp.) com 9.815.832 pb, conteúdo GC de 65,2%, e possui o maior número de genes (8.977; Figura 17). Dentre as *Paraburkholderia*, o maior genoma estimado é de AA00288, com 9.368.051 pb, e conteúdo GC de 63,5%, e o menor é de AA00382 com 7.715.435 pb e conteúdo GC de 64,3%. Já o menor genoma estimado é de AA00360 (*Herbaspirillum* sp.), com 5.736.116 pb e conteúdo GC de 63,1%, e, também, é o genoma que tem menor número de genes, com 5.119 (Figura 17).

O genoma de AA00380 (*Rhizobium* sp.) foi o segundo menor, com 7.064.579 pb, porém foi o que apresentou menos *contigs*, 130, e seu N50 foi de 200.011 pb. Em comparação com o AA00360 (*Herbaspirillum* sp.), por exemplo, que foi o menor genoma, que possui nº de *contigs* igual a 211 e N50 de 59.854 pb. Um *contig* N50 de tamanho N indica que 50% do genoma está representado em *contigs* iguais ou maiores que N pares de bases (CARDOSO, 2015).

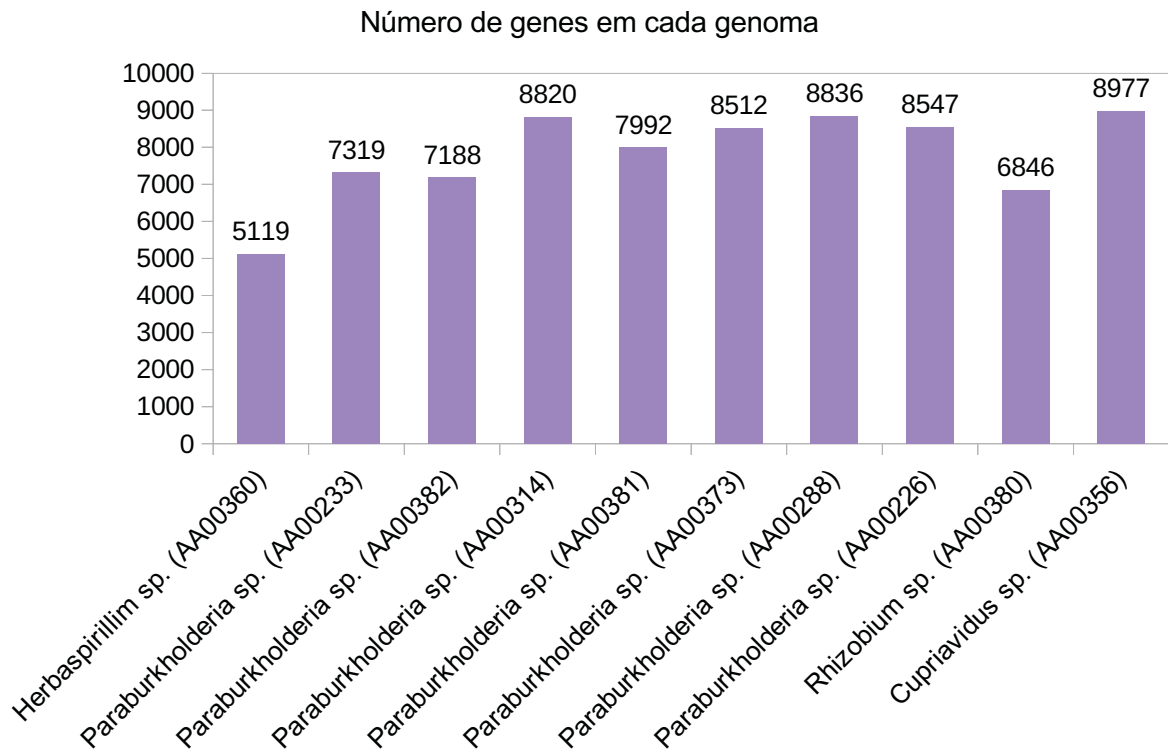


Figura 17. Total de genes de cada genoma. Valores obtidos do software online RAST 2.0.

Para verificar a classificação taxonômica das estirpes isoladas, foi utilizado o método de ANI (identidade média de nucleotídeos) com linha de corte de 95% (GORIS et al., 2007), o método GGDH (distância de hibridização entre dois genomas) com linha de corte de 70% (THOMPSON et al., 2013). O valor de ANI representa as identidades de regiões conservadas entre dois genomas e pode ser usada para medir a distância genética entre duas estirpes sendo comparadas (QIN et al., 2014).

Ao analisar a Tabela 8, foi possível confirmar que o isolado AA00382 pertence a espécie *Paraburkholderia mimosarum*, e que os isolados AA00373 e AA00381 pertencem a espécie *Paraburkholderia caribensis*. Os isolados AA00288 e AA00314, identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA como *P. mimosarum* (APÊNDICE 4), obtiveram o mesmo score quando comparados com os genomas de referência de duas estirpes de *P. mimosarum* (LMG23256 e STM3621), 34,80% e 39,10% respectivamente. O maior score observado para estes dois isolados foi em *Paraburkholderia nodosa* DSM21604 com 54,50%, porém com valor

abaixo de 70% não definiu-se a espécie. Sugere-se então, que AA00288 e AA00314 são da mesma espécie, e, a partir destes dados moleculares, sugere-se que caracterizam uma nova espécie.

O isolado AA00226 obteve um *score* de 22,10% ao compará-lo com a referência *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN. Seu maior *score* foi 56% comparado com *Paraburkholderia nodosa* DSM21604. O isolado AA00233 obteve seu maior *score* também na espécie *Paraburkholderia nodosa* DSM21604, com 39,30%. Sugere-se, então, que estes dois isolados podem caracterizar novas espécies.

Na Figura 18 foi revelado que, para ambas as análises, os isolados confrontados (AA00233, AA00226, AA00288 e AA00314) pertencem a mesma espécie. O valor de ANI, da matriz à direita, estão dentro da linha de corte, entre 98% e 100%. Os isolados AA00288 e AA00314 tiveram ANI de 100%, confirmando a espécie *Paraburkholderia mimosarum*. Ao confrontar AA00288 contra AA00226 e AA00233, ambos apresentaram ANI de 98%. O mesmo aconteceu entre o confronto de AA00314 contra AA00226 e AA00233.

Ainda na Figura 18, os valores de DDH, da matriz à esquerda, também estão dentro da linha de corte, entre 81% a 99,9%. A comparação dos isolados AA00288 x AA00314 resultou em 99,9%. Ao comparar os isolados AA00226 x AA00233, o resultado foi de 90,9%. O confronto entre AA00226 e AA00233 contra AA00288 e AA00314, resultou em 81% e 82,4%, respectivamente.

Tabela 7. Montagem e anotação das sequências genômicas de isolados de nódulos de *Mimosa* spp. do Sul do Brasil.

	Herbaspirillum sp. (AA00360)	Paraburkholderia sp. (AA00233)	Paraburkholderia sp. (AA00382)	Paraburkholderia sp. (AA00314)	Paraburkholderia sp. (AA00381)	Paraburkholderia sp. (AA00373)	Paraburkholderia sp. (AA00288)	Paraburkholderia sp. (AA00226)	Rhizobium sp. (AA00380)	Cupriavidus sp. (AA00356)
Tamanho (pb)	5.736.116	7.874.504	7.715.435	9.329.474	8.591.749	9.040.401	9.368.051	9.074.332	7.064.579	9.815.832
Conteúdo GC (%)	63,1	63,7	64,3	63,5	62,5	62,5	63,5	62,8	59,7	65,2
N60	59.854	29.596	82.064	82.530	21.799	38.556	80.787	3.338	200.011	51.013
L50	30	73	30	35	125	68	37	809	14	53
Nº contigs (PEGS)	2.11	557	228	307	778	453	339	3.927	130	1877
Nº subsistemas	480	520	538	536	526	531	535	481	495	562
Nº sequências codificantes	5.119	7.319	7.188	8.820	7.992	8.512	8.836	8.547	6.846	8.977
Nº RNAs	58	59	60	65	55	56	67	54	52	86

Tabela 8. GGDC entre *Paraburkholderia* spp. isoladas de nódulos de raízes de *Mimosa* spp. no estado do Paraná e espécies relacionadas.

Genoma de Referência	Genoma DDH % ¹						
	AA0038 2	AA0031 4	AA0038 1	AA0037 3	AA0023 3	AA0022 6	AA0028 8
<i>Paraburkholderia caribensis</i> MWAP64	23,20	22,80	91,60*	91,00*	23,00	24,10	22,80
<i>Paraburkholderia rhizoxinica</i> HKI454	21,70	21,20	21,10	21,20	21,30	22,10	21,20
<i>Paraburkholderia phytofirmans</i> PsJN	22,70	22,30	23,90	23,90	22,50	23,60	22,30
<i>Paraburkholderia phymatum</i> STM815	23,10	22,70	30,70	33,90	22,70	24,40	22,70
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> LB400	22,70	22,70	23,90	23,90	22,70	23,80	22,70
<i>Paraburkholderia mimosarum</i> LMG23256	93,50*	34,80	23,00	23,30	34,70	35,60	34,80
<i>Paraburkholderia mimosarum</i> STM3621	88,70*	39,10	0,00	0,00	33,70	36,80	39,10
<i>Paraburkholderia kururiensis</i> subsp. <i>thiooxydans</i> NBRC 107107	23,70	23,30	23,30	23,20	23,60	24,60	23,30
<i>Paraburkholderia ferrariae</i> NBRC106233	26,40	26,20	23,00	22,80	26,50	27,70	26,20
<i>Paraburkholderia bannensis</i> NBRC103871	26,40	26,20	23,00	22,90	26,50	27,70	26,20
<i>Paraburkholderia nodosa</i> DSM21604	29,70	54,50	21,80	22,60	39,30	56,00	54,50
<i>Paraburkholderia graminis</i> C4D1M	22,60	22,60	24,10	23,90	22,70	23,80	22,60
<i>Paraburkholderia caballeronis</i> TNe-841t	24,80	24,50	23,40	23,40	24,80	25,60	24,60
<i>Paraburkholderia tropica</i> PPe8	27,10	27,00	23,20	23,20	27,30	28,50	27,00
<i>Paraburkholderia piptadeniae</i> STM7183	23,50	23,40	30,40	30,80	23,50	25,00	23,40
<i>Paraburkholderia diazotrophica</i> LMG26031	23,30	23,80	30,00	30,90	23,40	25,40	23,80
<i>Paraburkholderia sacchari</i> LMG19450	27,60	27,50	23,30	23,20	27,50	29,00	27,50

¹ Porcentagem de Hibridização DNA-DNA calculada de sequências de genomas utilizando o GGDC 2.1 ferramenta *online* tool (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013), e utilizando o BLAST+ como parâmetro para ferramenta de alinhamento local. Valores acima de 70%, destacados em **negrito***, são da mesma espécie.

ANI %

		99	98	98	AA00233 (<i>P. humi</i>)
DDH %	90.90		98	98	AA00226 (<i>P. phytofirmans</i>)
	82.40	81.00		100	AA00288 (<i>P. mimosarum</i>)
	82.40	81.00	99.90		AA00314 (<i>P. mimosarum</i>)
	AA00233 (<i>P. humi</i>)	AA00226 (<i>P. phytofirmans</i>)	AA00288 (<i>P. mimosarum</i>)	AA00314 (<i>P. mimosarum</i>)	

Figura 18. Matriz de identidade para comparação todos contra todos os isolados entre genomas de isolados do gênero *Paraburkholderia*.

Tabela 9. GGDC e identidade na sequência do gene 16S rRNA entre os isolados AA00356 de nódulo de *Mimosa pudica* no estado do Paraná e estirpes de *Cupriavidus* spp. relacionadas.

	Genoma ¹	DDH % do Genoma (triângulo inferior) vs. Identidade 16S rRNA % (triângulo superior) ²									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>Cupriavidus necator</i> AA00356		98.3*	97.3	96.8	96.8	96.9	96.4	98.6	50.8	97.9
2	<i>C. necator</i> N-1	75.80*		97.7	97.9	98.2	98.3	98.1	97.7	50.5	97.0
3	<i>C. basilensis</i> 4G11	24.60	24.60		97.3	97.3	97.4	96.9	97.0	49.8	96.4
4	<i>C. gilardii</i> CR3	25.00	25.00	24.40		98.1	98.3	98.4	97.0	50.2	97.6
5	<i>C. nantongensis</i> X1	36.30	36.00	25.40	26.10		99.3	97.6	98.1	50.3	96.8
6	<i>C. taiwanensis</i> LMG19424	35.80	35.80	24.40	25.20	51.30		98.0	97.8	50.7	97.3
7	<i>C. metalidurans</i> CH34	23.70	23.80	23.10	24.30	24.60	24.00		96.5	49.9	98.1
8	<i>C. alkaliphilus</i> ASC-732	36.30	36.10	24.30	25.00	56.20	50.40	23.70		51.1	97.9
9	<i>C. oxalaticus</i> NBRC13593	33.00	32.80	24.50	25.40	32.40	32.30	24.10	32.40		50.4
10	<i>C. pauculus</i> KF709	23.90	23.90	23.00	24.90	25.20	24.10	25.60	23.80	24.20	

¹ As sequências de genomas de *Cupriavidus* foram obtidas do NCBI Genome ou do banco de dados Nucleotide sob os seguintes números de acesso (cada genoma é identificado pelo número na tabela):

1. Isolado obtido de nódulos de *Mimosa pudica*;
2. NC_015723 (1,540bp/1,540bp; cromossomo2), NC_015724 (plasmídeo), NC_015726 (1,538bp/1,540bp/**1,540bp**; cromossomo1), NC_015727 (plasmídeo);
3. NZ_CP010536 (**1536bp**/1,536bp/1,536bp/1,536bp; cromossomo principal), NZ_CP010537 (1,536bp; cromossomo secundário);
4. NZ_CP010516 (**1,536bp**/1,534bp/1,535bp; cromossomo1), NZ_CP010517 (1,535bp; cromossomo2);
5. NZ_CP014844 (1,540bp/1,439bp/1,540bp; cromossomo1), NZ_CP014845 (**1,541bp**/1,540bp; cromossomo2), NZ_CP014846 (plasmídeo);
6. NC_010528 (**1,540bp**/1,538bp/1,538bp; cromossomo1), NC_010530 (1,540bp/1,538bp; cromossomo2), NC_010529 (plasmídeo);
7. NC_007974 (**1,540bp**/1,540bp; megaplasmídeo), NC_007973 (1,540bp/1,540bp; cromossomo1), NC_007972 (plasmídeo), NC_007971 (plasmídeo);
8. *Draft, contigs* de FMAD01000001 to FMAD01000034;
9. *Draft, contigs* de BCWO01000001 to BCWO01000065;
10. *Draft, contigs* de BBQN01000001 to BBQN01000227.

²**Matriz triângulo inferior**, porcentagem de Hibridização DNA-DNA calculada a partir de sequências de genomas usando GGDC (do inglês *Genome-to-Genome Distance Calculator*, Calculadora de Distância entre dois Genomas) 2.1 ferramenta *on line* (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013), usando BLAST+ como parâmetro para ferramenta de alinhamento local, valores acima de 70% (mesma espécie) são mostrados em negrito*. **Matriz triângulo superior**, porcentagem de identidade para sequências do gene 16S rRNA, extraído das próprias sequências de genomas, e submetidos a alinhamento com múltiplas sequências usando ClustalW 1.8 pelo BioEdit 7.2.6; valores acima de 99% são mostrados em negrito*; para genomas com mais de uma cópia, foi escolhida a sequência mais longa; o comprimento da sequência pode influenciar na porcentagem observada, particularmente para *C. pauculus* KF709, com sequência significativamente curta, possivelmente devido ao genoma incompleto.

Ao analisar a Tabela 9, no triângulo inferior, foi verificado que o isolado AA00356 (*Cupriavidus* sp.) pertence à espécie *Cupriavidus necator* de fato, com score de 75,80% contra a referência *C. necator* N-1. O triângulo superior revelou que a Identidade por 16S rRNA está muito próxima de várias referências, porém está com 98,3% de identidade de *C. necator* N-1.

Essa análise também foi realizada para o isolado AA00380 (*Rhizobium* sp.). Como pode ser observado na Tabela 10, o score contra o genoma referência *Rhizobium tropici* CIAT899 foi de 36,10%, mesmo pela identificação do gene parcial 16S rRNA ter sido esta espécie a mais próxima. A análise corrida para o isolado AA00360 (*Herbaspirillum* sp.), mostrada na Tabela 11, revelou que o maior score foi para a referência *Herbaspirillum frisingense* GSF30, com 30%. Pode-se caracterizar outras duas novas espécies encontradas entre os isolados de nódulos de *Mimosa pudica*.

Após verificar que esses isolados são potenciais espécies novas, foi feita uma busca do gene *recA* para pegar a sequência de cada isolado, e construir um dendrograma utilizando uma sequência consenso ao unir as sequências do gene 16S rRNA, amplificadas e sequenciadas, e as sequências do gene *recA*, obtidas do sequenciamento dos genomas, para poder compará-los a outros isolados de nódulos de *Mimosa* spp. de trabalhos recentes.

Para complementar a análise, foram escolhidos isolados de trabalhos recentes que continham os genes 16S rRNA e *recA* amplificados e sequenciados (BONTEMPS et al., 2016; DALL'AGNOL et al., 2016; 2017), e estirpes referência de genomas sequenciados e depositados no *NCBI Genome*. As sequências de cada gene de cada isolado foram alinhadas separadamente, e depois foram unidas no editor de texto na ordem 16S-*recA*. Estas sequências consenso foram submetidas a construção da árvore filogenética, a qual resultou na Figura 19.

A bactéria *Escherichia coli* BL21 foi escolhida como indivíduo externo. Foi possível verificar que os alfa-rizóbios ficaram em um agrupamento separado dos beta-rizóbios. No agrupamento dos beta-rizóbios, formou-se 3 sub-agrupamentos. No primeiro sub-agrupamento, ficaram agrupados os isolados AA00373 e AA00381 (*P. caribensis*) muito próximos de isolados de Dall'agnol et al. (2017), e, também, da

estirpe referência *P. phymatum* STM815. No segundo sub-agrupamento, os isolados AA00233, AA00288 e AA00314 (*Paraburkholderia* sp.), que os cálculos moleculares não confirmaram a espécie e mostraram proximidades com *P. nodosa*, agruparam-se próximos de isolados de Dall'agnol et al. (2016) que se denominam *P. nodosa*, assim como na Tabela 8.

Tabela 10. GGDC entre o isolado AA00380 de nódulos de raízes de *Mimosa* sp. no estado do Paraná e estirpes de *Rhizobium* spp. relacionadas.

	DDH % do Genoma
Genoma de referência	AA00380
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	36.10
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	21.90
<i>Rhizobium phaseoli</i> N261	22.10
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7	28.00
<i>Rhizobium rhizogenes</i> NBRC 13257	25.20
<i>Rhizobium freirei</i> PRF81	30.50
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206	21.80
<i>Rhizobium bangladeshense</i> 1017	21.50

Tabela 11. GGDC entre o isolado AA00360 de nódulos de raízes de *Mimosa* sp. no estado do Paraná e estirpes de *Herbaspirillum* spp. relacionadas.

	DDH % do Genoma
Genoma de referência	AA00356
<i>Herbaspirillum frisingense</i> AA6	27.40
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1	28.30
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	28.90
<i>Herbaspirillum hiltneri</i> N3	22.70
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> IEH4430	28.40
<i>Herbaspirillum autotrophicum</i> IAM14942	21.20
<i>Herbaspirillum chlorophenicum</i> CPW301	25.90
<i>Herbaspirillum frisingense</i> GSF30	30.00
<i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>putei</i> IAM15032	28.20
<i>Herbaspirillum lusitanum</i> P6-12	23.10
<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i> UMS-37	22.30

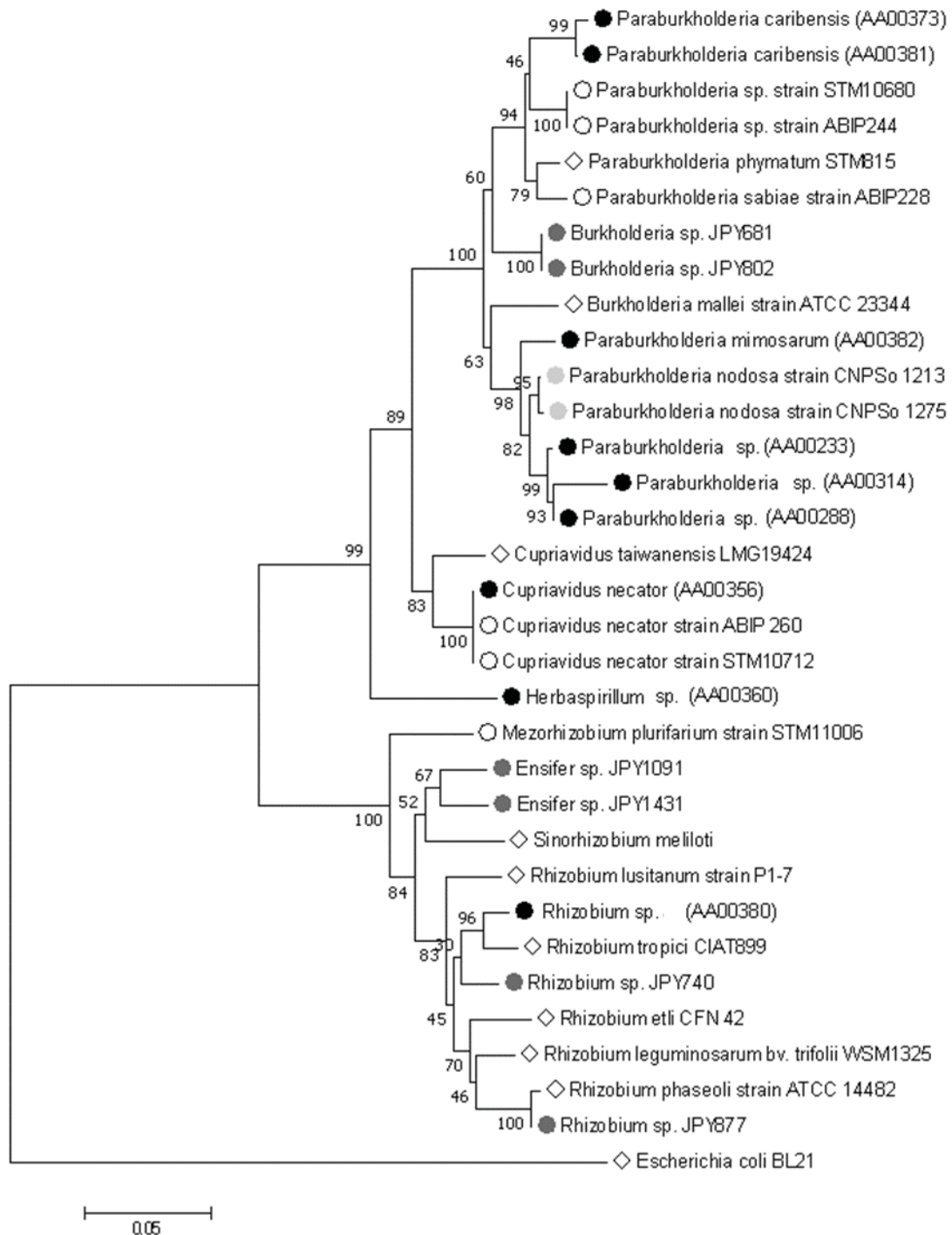


Figura 19. Árvore filogenética de MSLA dos genes 16S rRNA e *recA*.

O dendrograma foi inferido usando o método *Neighbor-Joining*. A porcentagem de replicatas em que os taxa foram clusterizados juntos no teste de *bootstrap* (500 replicatas) são mostradas nos ramos. A distância evolucionária foi computada usando o método *Maximum Composite Likelihood* e são por unidades de substituição de bases por posição. A análise envolveu 33 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo gaps ou informações faltantes foram eliminadas. O total de posições foi de 529. Esta análise foi conduzida no software MEGA 7 (KUMAR et al., 2016) (● isolados do presente trabalho; (● isolados de Bontemps et al. (2016); (● isolados de Dall'agnol et al. (2016); (○) isolados de Dall'agnol et al. (2017); e (◇) referências com genomas sequenciados e disponíveis no *NCBI Genome*, daonde tiveram as sequências de seus genes retiradas.

O terceiro sub-agrupamento mostrou o agrupamento do isolado AA00356 (*C. necator*) com outros *C. necator* isolados por Dall'agnol et al. (2017), com *bootstrap* de 100, ou seja, são muito similares. O isolado AA00360 (*Herbaspirillum* sp.) posicionou-se como gênero externo neste agrupamento dos beta-rizóbios.

No segundo agrupamento dos alfa-rizóbios, apesar do isolado AA00380 (*Rhizobium* sp.) ter DDH de 36,10% em relação ao *Rhizobium tropici* CIAT899 na Tabela 10, agrupou-se com esta estirpe referência, e próximo de um *Rhizobium* sp. JPY740 isolado por Bontemps et al. (2016). Isto pode indicar que este isolado (AA00380) é uma espécie próxima de *R. tropici* CIAT899.

Para verificar se os isolados teriam ou não a capacidade de nodular/fixar nitrogênio, foi tentado amplificar os genes através de PCR com diversos oligonucleotídeos iniciadores. Porém, não foram obtidas amplificações, apesar do teste de nodulação preliminar ter dado positivo para alguns isolados.

Então, um possível procedimento adotado para verificar de que estes isolados têm capacidade de fixar nitrogênio e/ou nodular leguminosas, foi realizar uma análise nos genomas da presença ou ausência de genes de fixação de nitrogênio (*nifHDK*) e genes de nodulação (*nodABC*).

Foi verificado que os genes *nifH* e *nodC* estão presentes em 5 isolados sequenciados: AA00226, AA00288, AA00314, AA00373 e AA00356. Suas sequências foram copiadas em um novo arquivo de texto para, posteriormente, poder gerar uma árvore filogenética de cada gene. Para complementar a análise, foram escolhidos isolados de trabalhos recentes que continham os genes *nifH* e *nodC* amplificados e sequenciados (DALL'AGNOL et al., 2016; TAULÉ et al., 2012), e estirpes de referência de genomas sequenciados e depositados no *NCBI Genome* em busca de similaridades.

Das referências utilizadas para a árvore filogenética de 16S-*recA*, nenhuma tinha amplificações do gene *nifH*. Em virtude, foi utilizado sequências de isolados de Taulé et al. (2012) e de referências do *NCBI Genome* (Figura 20). Já para a árvore filogenética do gene *nodC*, as referências utilizadas foram de Taulé et al. (2012), Dall'agnol et al. (2016) e referências do *NCBI Genome* (Figura 21).

O isolado AA00373 posicionou-se muito próximo de *Paraburkholderia* sp. STM10680 e *Paraburkholderia* sp. ABIP244, isolados de Dall'agnol et al. (2016), nas três as árvores (Figura 19, 20 e 21), revelando que possuem uma ancestralidade em comum. Não houve a amplificação de *nifH* disponível destes isolados. Entretanto, AA00373 permaneceu ao lado de *Paraburkholderia phymatum* STM815 da mesma maneira nas árvores *nifH* e *nodC*, o que indica ter havido transferência horizontal destes dois genes de *P. phymatum* STM815 para o ancestral de *P. caribensis* AA00373.

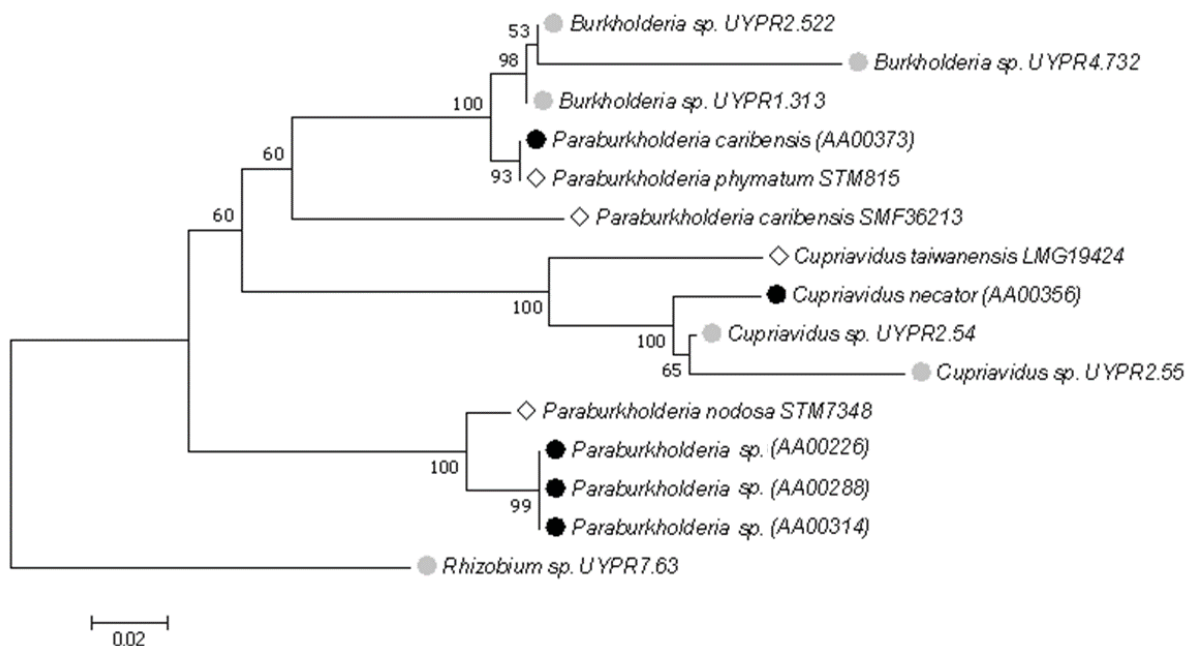


Figura 20. Árvore filogenética do gene *nifH* de isolados de *Mimosa* spp.

(●) isolados do presente trabalho; (●) isolados de Taulé et al. (2012); e (◇) referências com genomas sequenciados e disponíveis no NCBI *Genome*, daonde tiveram as sequências de seus genes retiradas.

O dendrograma foi inferido usando o método *Neighbor-Joining*. A porcentagem de replicatas em que os taxa foram clusterizados juntos no teste de *bootstrap* (500 replicatas) são mostradas nos ramos. A distância evolucionária foi computada usando o método *Maximum Composite Likelihood* e são por unidades de substituição de bases por posição. A análise envolveu 17 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo gaps ou informações faltantes foram eliminadas. O total de posições foi de 239. Esta análise foi conduzida no software MEGA 7 (KUMAR et al., 2016).

Nas árvores das Figura 20 e 21, pôde-se verificar que, os isolados AA00226, AA00288 e AA00314 se posicionaram ao lado de *Paraburkholderia nodosa* STM7348, assim como na árvore filogenética dos genes *16S-recA* (Figura 19), indicando um ancestral comum entre *P. nodosa* e os isolados *Paraburkholderia* sp.

AA00226 e *Paraburkholderia* sp. AA00288-AA00314. Estas que são duas novas espécies, por comprovação com os dados moleculares da Tabela 8.

O isolado AA00356 posicionou-se com *Cupriavidus* sp. UYPR2.54 e *Cupriavidus* sp. UYPR2.55, revelando que, provavelmente, não sejam da espécie *C. necator*, como o AA00356 é. Nas árvores de *nodC* e 16S-*recA*, o AA00356 posicionou-se juntamente aos *Cupriavidus necator*, sendo confirmada sua espécie, também baseado em dados da Tabela 9.

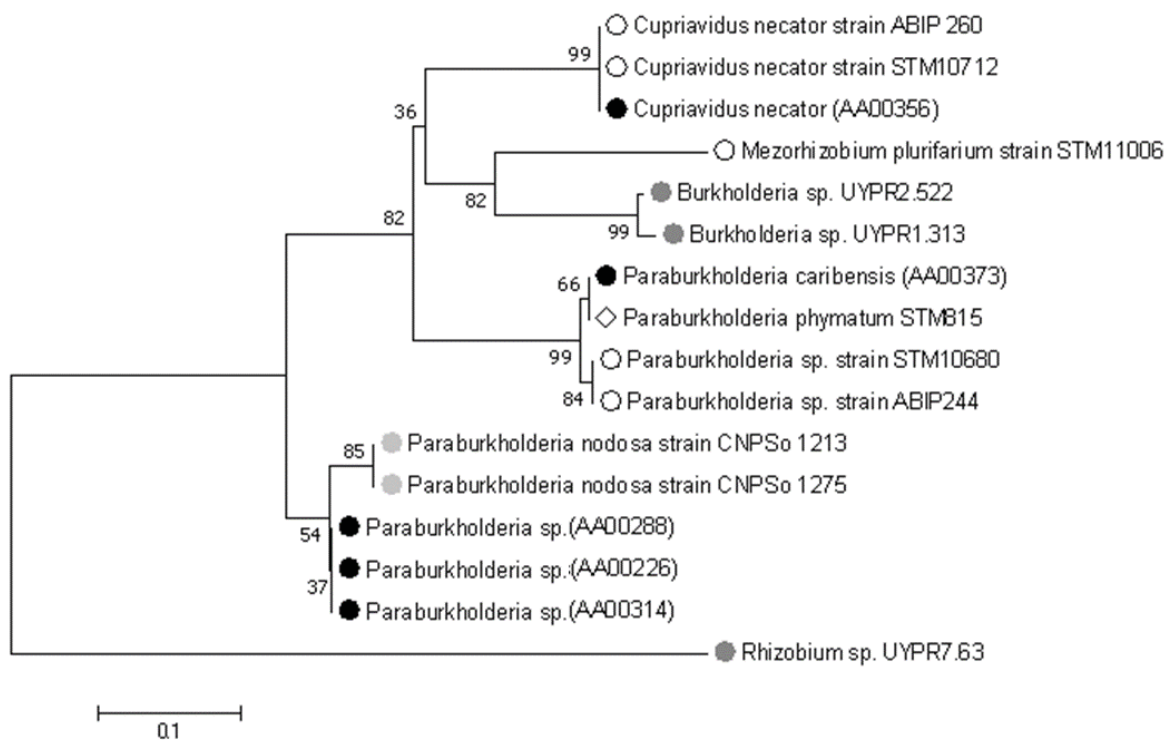


Figura 21. Árvore filogenética do gene *nodC* de isolados de *Mimosa* spp.

(●) isolados do presente trabalho; (◐) isolados de Taulé et al. (2012); (○) isolados de Dall'agnol et al. (2016); e (◊) referências com genomas sequenciados e disponíveis no NCBI *Genome*, daonde tiveram as sequências de seus genes retiradas.

O dendrograma foi inferido usando o método *Neighbor-Joining*. A porcentagem de replicatas em que os taxa foram clusterizados juntos no teste de *bootstrap* (500 replicatas) são mostradas nos ramos. A distância evolucionária foi computada usando o método *Maximum Composite Likelihood* e são por unidades de substituição de bases por posição. A análise envolveu 15 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo gaps ou informações faltantes foram eliminadas. O total de posições foi de 305. Esta análise foi conduzida no software MEGA 7 (KUMAR et al., 2016).

6 DISCUSSÃO

COLETAS DE *Mimosa* spp. E SOLOS

Quatro *Mimosa* spp. coletadas no presente trabalho, já tiveram seus nódulos estudados, sendo *M. dolens* e *M. flocculosa* por Lammel et al. (2013), e *M. pudica* e *M. bimucronata* por Chen et al. (2003). Ambos os trabalhos identificaram a presença de bactérias simbióticas, do tipo beta-rizóbios, pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* nos nódulos destas espécies. Contudo, as espécies de *Mimosa* têm a capacidade de adaptar-se as populações de bactérias de locais diferentes, podendo ser encontrados, também, *Cupriavidus* e alfa-rizóbios (BONTEMPS et al., 2010).

O pH e N no solo podem influenciar a ocorrência de beta-rizóbios, sendo observado preferência de infecção por *Paraburkholderia* spp. nos nódulos em solos com pH ácido, pobre em nutrientes, até mesmo em regiões montanhosas (BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS et al., 2010; GYANESHWAR et al., 2011; MOULIN et al., 2015). *Paraburkholderia* e *Mesorhizobium* spp. têm sido isolados de solos ácidos com pH na faixa de 3,18 a 6,7. As *Paraburkholderia* são capazes de crescer num pH entre 4,5 a 8,0 sem prejudicar o desenvolvimento, enquanto que *Mesorhizobium* não cresce em pH abaixo de 5 (BRINK et al., 2016).

Em contrapartida, quando é observado um aumento na concentração de nutrientes no solo da rizosfera, a competição entre uma ou outra espécie pode ser favorecida (SPRENT et al., 2017). Por exemplo, espécies de *Cupriavidus* tendem a predominar nos nódulos em solos neutros a alcalinos e que tenham alta concentração de metais pesados naturalmente (SPRENT et al., 2017), como foi encontrado no Uruguai em áreas de mineração (PLATERO et al., 2016).

Elliott et al. (2009) mostrou em seus experimentos de competição, que as estirpes de *Paraburkholderia mimosarum* PAS44 e *Paraburkholderia phymatum* STM815 predominam na simbiose em *Mimosa pudica* e *Mimosa diplotricha*, quando

em competição com *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424. Todavia, essa dominância pode ser amenizada a favor do *C. taiwanensis* se tiver disponível o nitrogênio (amônio ou nitrato) no meio.

Segundo Brink et al. (2016), a água limitada, ou sua escassez, diminui a fotossíntese e abaixa os níveis de seus produtos, que são essenciais para o *Rhizobium tropici* fixar o N₂. Além disso, solos com pH alto estão associados à baixa produção de Fatores Nod, sendo o pH ótimo para rizóbios em torno de 5,5.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre influência da altitude em que os espécimes de *Mimosa* foram coletados. Já as demais espécies de *Mimosa*, listados na Tabela 3, ainda não tinham sido estudadas, sendo estes resultados inéditos para a literatura.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

A literatura existente é escassa sobre o tema de diversidade bacteriana de nódulos de leguminosas nativas no Paraná (EMBRAPA, 1982). Estas bactérias têm grande importância, pois potencialmente interferem na fixação biológica de nitrogênio, a principal forma de incorporação deste elemento em ecossistemas naturais, promovem o crescimento vegetal e também apresentam potencial biotecnológico (SPRENT, 2001; MOULIN et al., 2015).

Primieri et al. (2016) publicou seu trabalho tendo encontrado gêneros endofíticos *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Serratia* e *Arthrobacter*, que foram encontrados pela primeira vez em *Mimosa scabrella* distribuídas por toda Floresta Ombrófila Mista (FOM), no estado de Santa Catarina. Apesar deste grupo de bactérias não apresentar a capacidade de indução de nódulos em raízes de *Mimosa* spp., estes resultados sugerem que estes gêneros podem ocorrer como oportunistas na ocupação dos nódulos. Entretanto, Primieri obteve a maioria de seus isolados, de nódulos de *Mimosa scabrella*, identificados como *Paraburkholderia nodosa*, *P.*

mimosarum e *P. phytofirmans*, que demonstraram capacidade de fixar N₂; e um *Rhizobium*, também capaz de fixar N₂.

Bournaud et al. (2013) isolou beta-rizóbios da região Sudeste do Brasil, encontrando *Paraburkholderia*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* como a maioria de seus isolados. Um dos pontos de coleta deste trabalho estava localizado na cidade de Telêmaco Borba, no estado do Paraná, sendo isolado três *Paraburkholderia caribensis* e uma *Paraburkholderia nodosa* nos nódulos da planta hospedeira *Anadenanthera peregrina*. Ainda sobre este trabalho, também foi encontrado dois simbiontes (*Paraburkholderia* e alfa-rizóbio) compartilhando um mesmo nódulo, em seis hospedeiros.

Bontemps et al. (2010) isolou bactérias de 47 espécies de *Mimosa* spp., na região Central do Brasil, onde foram encontradas: *Paraburkholderia mimosarum*, *P. nodosa*, e *P. caribensis*, assim como neste trabalho; e *Paraburkholderia tuberum* e *P. phymatum*. Apesar de *P. tuberum* ser uma espécie frequentemente encontrada em nódulos de *Mimosa* spp. no Brasil e Guiana Francesa (BOURNAUD et al., 2013), não foi encontrada nas plantas e áreas amostradas neste trabalho.

No Brasil, há três trabalhos em que foram encontrados *Cupriavidus* simbiontes. Dall'agnol et al. (2017) que utilizou *M. pudica* e *Phaseolous vulgaris* (feijão) como hospedeiros-isca para determinação da diversidade de simbiontes presentes em amostras de solos da Mata Atlântica, no estado de Rio de Janeiro. Florentino et al. (2009) que isolou *Cupriavidus* de amostras de solos de pastos no estado de Minas Gerais, também utilizando como hospedeiros-iscas o feijão comum (*P. vulgaris*) e *Leucaena leucocephala*. Da Silva et al. (2012) trabalhou com os isolados de Florentino et al. (2009) e comprovou que os *Cupriavidus* encontrados têm a capacidade de nodular e fixar N₂ em cinco leguminosas diferentes: *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolous vulgaris* e *Vigna unguiculata*.

Estes três trabalhos citados acima, utilizaram em comum o método de planta hospedeiro-isca para isolar bactérias nodulantes de amostras de solos coletados. Contudo, o isolado identificado como pertencente ao gênero *Cupriavidus* obtido neste trabalho foi encontrado em uma planta *Mimosa pudica* coletada a campo,

assim como Primieri et al. (2016) que também encontrou *Cupriavidus* em nódulos de *Mimosa scabrella* coletadas na Floresta Ombrófila Mista do estado de Santa Catarina, mas sem capacidade de fixar N₂, observado pelo autor.

Por outro lado, Platero et al. (2016) encontrou uma predominância de *Cupriavidus* em amostras no Sudeste do Uruguai, em solos com condições de acidez moderada (pH 5,8) e altos níveis de cobre e zinco (Cu e Zn), favorecendo esta simbiose com *Mimosa*. Estes dados complementam a afirmação de Bontemps et al. (2010) de que *Cupriavidus* e alfa-rizóbios tornam-se mais importantes para a margem norte da distribuição de espécies de *Mimosa*, também sendo encontrados na face sul desta distribuição vegetal.

Originalmente, *Cupriavidus necator* foi encontrado em *Parapiptadenia rigida*, no Uruguai (TAULÉ et al., 2012), e em *Phaseolus vulgaris*, no Brasil (FLORENTINO et al., 2009). Contudo, neste presente trabalho foi isolado de *M. pudica* que estava presente em solo de pH 7,0, livre de metais pesados. Em conjunto, estes resultados sugerem que *Cupriavidus* encontra-se presente no solo em diferentes regiões do Brasil, mas não é frequentemente isolado de nódulos de *Mimosa* spp., possivelmente, devido a condições desfavoráveis de competição com outros grupos de bactérias, principalmente *Paraburkholderia*.

Bontemps et al. (2016) realizou um trabalho no México, onde isolou, principalmente, *Ensifer* sp. e *Rhizobium* sp. de 15 espécies de *Mimosa*, sendo que na maioria das plantas foram encontrados os dois gêneros, e em apenas uma planta, *Mimosa skinneri*, foi encontrado *Rhizobium* e *Paraburkholderia*. O que os autores concluíram foi que as espécies endêmicas de *Mimosa* mexicanas preferem alfa-rizóbios como simbiotes.

Ao encontrar duas bactérias simbióticas em um mesmo hospedeiro (*Paraburkholderia* e *Rhizobium* de um espécime de *Mimosa pudica* e de *Mimosa murex*, ou *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* de outro espécime de *Mimosa pudica*), entende-se que o reconhecimento hospedeiro-simbionte possui baixa especificidade, e/ou há baixa competitividade entre as bactérias (PRIMIERY et al., 2016). Um dos fatores que poderiam determinar qual bactéria teria predominância na infecção seriam as condições de solos, como pH, composição química e disponibilidade de N,

que favoreçam um ou outro grupo de bactérias. Testes de competitividade teriam que ser feitos para poder verificar se a planta também tem preferência de bactéria infectante.

Lammel et al. (2013) isolou *Pseudomonas* e *Pantoea* de *Mimosa scabrella*, também em Floresta Ombrófia Mista, em Campos do Jordão/SP. *Pseudomonas* não é reportado como contendo espécies capazes de nodular leguminosas. Entretanto, estes dois gêneros possuem representantes endofíticos, associados com diferentes grupos taxonômicos de plantas, que possivelmente podem ocupar os nódulos oportunisticamente (PRIMIERY et al., 2016).

Segundo Moulin et al. (2015), o gênero *Herbaspirillum* é um possível candidato a adquirir função nodulatória futuramente através de transferência horizontal de genes. Além de ser encontrado neste trabalho, também já foi reportado o isolamento de *Herbaspirillum lusitanum* em nódulos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) sem capacidade nodulatória (VALVERDE et al., 2003). Algumas espécies já são conhecidas por associar-se as plantas, fixar nitrogênio e promover o crescimento vegetal (PEDROSA et al., 2011; MONTEIRO et al., 2012), e acredita-se que ele pode ter entrado no nódulo de maneira oportunística por ser uma bactéria endofítica de tecidos da raiz.

GUPTA (2000) afirma em seu trabalho que as Gama e Betaproteobactérias são muito próximas e que seu ancestral comum veio depois da formação de Alfaproteobactéria.

TESTE DE NODULAÇÃO

Como citado anteriormente, Primieri et al. (2016) também isolou *P. phytofirmans* em Santa Catarina. Entretanto, esta espécie foi descrita por Sessitsch et al. (2005), isolada de raiz de cebola na Holanda, e não apresenta redução de nitrato ou nitrito, tampouco comentam sobre nodulação. Sendo assim, esta bactéria

se torna uma das mais importantes do trabalho com potencial de ser, ao menos, uma nova estirpe, para sequenciamento genômico e futuros estudos.

A espécie *Paraburkholderia humi* foi descrita por Vandamme et al. (2013), e foi isolada de solo rizosférico de pastagem na Holanda, também não tem atividade de redução de nitrato e nitrito e os autores não mencionam sobre sua capacidade de nodulação. Este isolado também tem potencial para caracterizar uma nova estirpe, sendo importante dar prioridade às análises de seu genoma.

Já é conhecido que *Paraburkholderia phymatum* é nodulante, pois foi descrita por Chen et al. (2006) ao ser isolada de *Mimosa pigra* e *Mimosa scabrella* da Taiwan e América do Sul.

Da Silva et al. (2012) foi o primeiro autor a isolar *Cupriavidus necator* no país, em Minas Gerais, e seus isolados tinham capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio. O estudo aprofundado deste isolado é de grande interesse por ter potencial a caracterizar uma estirpe nova.

No mesm trabalho de Da Silva et al. (2009), os autores utilizaram exudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* para auxiliar na inoculação de *Rhizobium tropici* em outras leguminosas de interesse agrônômico. Já sobre o *Rhizobium jaguaris*, Rincón-Rosales et al. (2013) isolou, pela primeira vez, *R. jaguaris* de nódulos efetivos de *Calliandra grandiflora*. Ao realizar testes de nodulação, pôde observar que é capaz de nodular esta planta produzindo nódulos ativos, que fixam nitrogênio.

Não foi encontrado na literatura algum trabalho que reportasse o isolamento de *Rhizobium tropici* em *Mimosa* spp., e nem do gênero *Herbaspirillum* que seja capaz de nodular qualquer leguminosa.

7 CONCLUSÕES

Paraburkholderia foi o gênero predominante em nódulos de *Mimosa* spp. coletadas no estado do Paraná, Sul do Brasil, como já anteriormente reportado para outras regiões no Brasil. Para alguns dos isolados, o rascunho da sequência genômica foi obtido, permitindo a identificação taxonômica em nível de espécie, com dois isolados de *Paraburkholderia caribensis* e um isolado de *Paraburkholderia mimosarum*, todos confirmados como espécies nodulantes por ensaio de re-inoculação em *Mimosa pudica*. A capacidade de nodulação de ambas as espécies já foi anteriormente relatada. Entretanto, quatro outros isolados, que também confirmaram sua capacidade de nodulação, possuem potencial para constituírem novas espécies. Para o isolado de *Cupriavidus*, a identificação em nível de espécie, baseada na sequência genômica, indicou que pertence a *C. necator*, também confirmado com espécie nodulante. Por outro lado, os ensaios de nodulação em *M. pudica* e a análise da sequência genômica mostraram que o isolado de *Herbaspirillum* sp. provavelmente não é capaz de induzir a formação de nódulos em raízes e pode ter sido isolada dos nódulos como uma bactéria endofítica oportunística.

No escopo da pesquisa fica observado que após a realização de várias coletas nas regiões anteriormente denominadas no trabalho, não foi possível realizar a observação do pressuposto inicial da pesquisa de que a região do Paraná seria uma possível zona de transição. Assim acredita-se que a região de transição esteja localizada ainda mais ao sul do Brasil, na região do estado de Santa Catarina, ou ainda, Rio Grande do Sul.

Ademais, confirmou-se que as bactérias AA00288 e AA00314 são da mesma espécie (*Paraburkholderia* sp.1), assim como AA00233 (*Paraburkholderia* sp.2), próximas de *Paraburkholderia nodosa*, AA00226 (*Paraburkholderia* sp.3), e AA00360 (*Herbaspirillum* sp.4) propõem-se como novas espécies.

Como perspectivas do trabalho, ficam sugestões de realizar novos testes de nodulação com outras *Mimosa* spp., e com outras espécies de leguminosas, para teste de especificidade e testes de competição entre simbiotes; realizar testes de

eficiência de fixação de nitrogênio e produção de outras substâncias que promovam o crescimento vegetal; realizar novas análises em MALDI-TOF MS, submetendo o crescimento dos isolados em meio de cultivo TY para estimulação mínima de EPS; analisar os genomas das possíveis 5 novas espécies de bactérias encontradas (3 *Paraburkholderia* sp., 1 *Rhizobium* sp. e 1 *Herbaspirillum* sp.); desenhar oligonucleotídeos iniciadores para os genes *recA*, *nifH* e *nodC* destes isolados para caracterização de novos isolados da região.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. H.; MCLAUGHLIN, W. Ecology and genetics of tropical rhizobia species. **Biotech Adv**s, vol. 3, p. 155-170, 1985.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMBIENTE Brasil. Disponível em:
(http://ambientes.ambientebrasil.com.br/natural/regioes_fitocologicas.html).
Acesso em: 04.Mar.2018.
- AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 75, 2008.
- BAEV, N.; KONDOROSI, A. Nucleotide sequence of the *Rhizobium meliloti* nodL gene located in locus n5 of the nod regulon. **Plant Mol Biol.**, v. 18, n. 4, p. 843-846, 1992.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 37-40, 1987.
- BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 241-250, 1995.
- BONTEMPS, C.; ELLIOTT, J. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS, F. B. JÚNIOR; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; ELIAS, N. NETO; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, vol. 19, p. 44–52, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x.
- BONTEMPS, C.; ROGEL, M.A.; WIECHMANN, A. et al. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist**, v. 209, p. 319–333, 2016.
- BOURNAUD, C.; FARIA, S. M.; SANTOS, J. M. F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS, E.; JAMES, E. K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. *Burkholderia* Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the *Piptadenia* Group (Tribe Mimoseae). **PLoS ONE**, vol. 8, n. 5, p. e63478, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0063478.
- BOURNAUD, C.; MOULIN, L.; CNOCKAERT, M.; de FARIA, S.; PRIN, Y.; SEVERAC, D.; VANDAMME, P. *Paraburkholderia piptadeniae* sp. nov. and *Paraburkholderia*

- ribeironis* sp. nov., two root-nodulating symbiotic species of *Piptadenia gonoacantha* in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 67, p. 432–440, 2017. DOI: 10.1099/ijsem.0.001648.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa da Área de Aplicação da Lei no 11.428, de 2006**. Escala 1:5.000.000. Disponível em: (https://ww2.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/mapas_doc6.shtm). Acesso em: 04.Mar.2018.
- BRETTIN, T.; DAVIS, J.J.; DISZ, T.; et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8365, 2015.
- BRINK, C.; POSTMA, A.; JACOBS, K. Rhizobial diversity and function in rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia* spp.) plants: A review. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 80-86, 2017.
- BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; et al. Flavonid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbiosis. **Journal of Bacteriology**, vol. 188, p. 3654-3663, 2006.
- BURRIS, R.H. Minireview: Nitrogenases. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.9339-9342, 1991.
- CARDOSO, R.L.A. **Análise genômica comparativa de bactérias do gênero *Herbaspirillum***. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- CHEN, W.M.; DE FARIA, S.M.; CHOU, J.H. et al. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 58, p. 2174–2179, 2008.
- CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; COENYE, T. et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 56, p. 1847–1851, 2006.
- CHEN, W. M.; de FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; et al. *Burkholderia nodosa* sp nov isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, vol. 57, p. 1055-1059, 2007.
- CHEN, W.M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVNI-MASSON, C. Legume Symbiotic Nitrogen by β -Proteobacteria is widespread in Nature. **J Bacteriol**, 85:7266–7272, 2003a.
- CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; PRESCOTT, A.R. et al. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Mol Plant Microbe**, v. 16, p. 1051–1061, 2003b.

- CHEN, W.M.; LAEVENS, S.; LEE, T.M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov. isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. **Int J Syst Evol Micr**, v. 51, p. 1729–1735, 2001.
- COUTINHO, A.P.S. **Revisão taxonômica e estudos filogenéticos de *Mimosa* L. sect. *Calothamnus* Barneby (Leguminosae – Mimosoideae)**. 311 f. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CREWS, T. E.; PEOPLES, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 102, p. 279-297, 2004.
- DA SILVA, K.; FLORENTINO, L.A.; DA SILVA, K.B.; DE BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F.M.S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 35 p. 175–182, 2012.
- DALL'AGNOL, R.F.; PLOTTEGHER, F.; SOUZA, R.C.; MENDES, I.C.; DOS REIS JR., F.B.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, p. fiw108, 2016.
- DALL'AGNOL, R.F.; BOURNAUD, C.; DE FARIA, S.M.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, 2017.
- DE MEYER, S. E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; VAN WYK, B. E.; VANDAMME, P.; HOWIESON, J. G. *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, p. 1090-1095, 2014. DOI: 10.1099/ijs.0.058602-0.
- DE MEYER, S. E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; MAKER, G.; YATES, R.; et al. *Burkholderia sprentiae* sp. nov. isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules from South Africa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2013b. DOI: 10.1099/ijs.0.048777-0.
- DE MEYER, S. E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; TRENGOVE, R. D.; GARAU, G.; et al. 2013a. *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov. isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules from South Africa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2013a. DOI: 10.1099/ijs.0.048751-0
- DEBELLÉ, F.; MOULIN, L.; MANGION, B.; DÉNARIE, J.; BOIVIN, C. Nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. **Acta Biochimica Polonica**, vol. 48, p. 359-365, 2001.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil biology and biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997.
- DOS REIS, F.B.; JR SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, p. 934–946, 2010.
- EHRHARDT, D. W.; ATKINSON, E. M.; LONG, S. R. Depolarization of alfafa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. **Science**, vol. 256, p. 998-1000, 1992.
- ELIAS, T.S. Mimosoideae. In R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.) *Advances in Legume Systematics*. **Kew, Royal Botanic Gardens**, part 1, p. 143-152, 1981.
- ELLIOTT, G.N.; CHOU, J.H.; CHEN, W.M. et al. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environ. Microbiol.**, v. 11, p. 762–78, 2009.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 7., Associações biológicas entre espécies florestais e microorganismos para aumento da produtividade econômica dos reflorestamentos. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS. 1982. Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, p. 33-52, 1982.
- FERGUSON, B. J. Rhizobia and legume nodulation genes. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, 2nd edition, Vol. 6, p. 236-239, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01046-9.
- FERREIRA, L.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GARCÍA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GONZÁLES-BUITRAGO, J.M.; VELÁSQUEZ, E. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5: e20223, 2011.
- FLORENTINO, L.A.; GUIMARÃES, A.P.; RUFINI, M.; DA SILVA, K.; MOREIRA, M.S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, v.66, n.5, p.667-676, 2009.
- GILLER, K. E.; CADISCH, G. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1-2, p. 255-277, 1995.
- GLOUDEMANS, T.; BISSELING, T. Plant gene expression in early stages of the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Science**, vol. 65, p. 1-14, 1989.
- GOURION, B.; BERRABAH, F.; RATET, P.; STACEY, G. *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. **Trends in Plant Science**, p. 1-9, 2014.

- GOVERS, F.; MOERMAN, M.; DOWNIE, J. A.; HOYKAAS, P.; FRANSSEN, H. J.; LOUWERSE, J.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. *Rhizobium* nod genes are involved in inducing and early nodulin gene. **Nature**, vol. 323, p. 564-566, 1986.
- GUPTA, R. S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 367-402, 2000.
- GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A.N.; MOULIN, L.; CHEN, W.M.; ELLIOTT, G.N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; GROSS, E.; dos REIS, F.B.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES E.K. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. **MPMI**, v. 24, n. 11, 2011. DOI:10.1094 /MPMI -06-11-0172.
- HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965-2982, 1996.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Manual técnico da vegetação brasileira**. 2ª ed. 271 f. Rio de Janeiro, 2012.
- JAMES, E.K. Nitrogen Fixation. **Plant Nutrition: Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. Elsevier Ltd. 2nd edition, v. 1, p. 271-277, 2017.
- KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 895-899, 1983.
- KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389-397, 1994.
- KONDOROSI, A. Regulation of nodulation genes in Rhizobia. In *Molecular signals in plant microbe communications* (ed. D.P.S. Verma), pp. 325-340. CRC Press, 1992.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.
- LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, p. 981-993, 2001.
- LAMMEL, D.R. **Diversidade de rizóbios e Floresta de Araucária no Estado de São Paulo**. 117f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- LAMMEL, D. R.; CRUZ, L. M.; CARRER, H.; CARDOSO, E. J. B. N. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 29, p. 2335–2342, 2013.

- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. /In /STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M. (Eds.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics** p. 115–148, 1991.
- LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, vol. 169, p. 2– 17, 2014.
- LEMAIRE, B.; DLODLO, O.; CHIMPHANGO, S.; STIRTON, C.; SCHRIRE, B.; BOATWRIGHT, J. S.; HONNAY, O.; SMETS, E.; SPRENT, J.; JAMES, E. K.; MUASYA, A. M. Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 2, p. 1-17, 2015. DOI: 10.1093/femsec/fiu024.
- LIMA et al. Fabaceae. In R.C. Forzza et al. (eds.) Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: (<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>). Acesso em: 04.Mar.2018.
- LPSN: List of Prokariotic Names. Disponível em: (<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>); (<http://www.bacterio.net/paraburkholderia.html>). Acesso em: 12.Jan.2018.
- MASSON-BOIVIN, C.; SACHS, J. L. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia — the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 44, p. 7–15, 2018. DOI: 0.1016/j.pbi.2017.12.00.
- MELILLO, J. M.; HOUGHTON, R. A.; KICKLIGHTER, D. W.; MCGUIRE, A. D. Tropical deforestation and the global carbon budget. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 293-310, 1996.
- MEIER-KOLTHOFF, J.P.; AUCH, A.F.; KLENK, H.P.; GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, 2013.
- MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A.M. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, p. 175–196, 2012.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2a edição. Editora UFLA, 729p. 2006.
- MOULIN, L., JAMES, E.K., KLONOWSKA, A., DE FARIA, S.M., SIMON, M.F. Phylogeny, diversity, geographical distribution and host range of legume-nodulating Betaproteobacteria: what is the role of plant taxonomy? In: **Biological Nitrogen Fixation**, Vol.1. Ed. de Bruijn, F. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. 2015.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass o Proteobacteria. **Nature**, vol. 411, p. 948-950, 2001.

- OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G.D.; et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D206-D214, 2014.
- PARKER, M. A.; WURTZ, A.; PAYNTER, Q. Nodule Symbiosis of Invasive *Mimosa pigra* in Australia and in Ancestral Habitats: A Comparative Analysis. **Biological Invasions**, vol. 9, p. 127-138, 2007.
- PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; AYUB, R.A.; et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genet.**, v.7, e1002064, 2011.
- PLATERO, R.; JAMES, E.K.; RIOS, C.; IRIARTE, A.; SANDES, L.; ZABALETA, M.; BATTISTONI, F.; FABIANO, E. Novel *Cupriavidus* Strains Isolated from Root Nodules of Native Uruguayan *Mimosa* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 3150-3164, 2016.
- PRIMIERY, S.; COSTA, M.D.; STROSCHEIN, M.R.D.; STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; ANTUNES, P.M. Variability in symbiotic effectiveness of N₂ fixing bacteria in *Mimosa scabrella*. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 19–25, 2016. DOI: 10.1016/j.apsoil.2016.01.018.
- QIN, Q.L.; XIE, B.B.; ZHANG, X.Y. et al. A Proposed Genus Boundary for the Prokaryotes Based on Genomic Insights. **Journal of Bacteriology**, v. 196, p. 2210-2215, 2014.
- RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.
- RINCÓN-ROSALES, R.; VILLALOBOS-ESCOBEDO, J.M.; ROGEL, M.A.; MARTINEZ, J.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3423–3429, 2013.
- RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; GLÖCKNER, F.O.; PEPLIES, J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, p. 929-931, 2015. pii: btv681
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.1, n.3, p.231-233, 1975.
- SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R.S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. Nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 1-23, 2014.

- SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A.V.; VANDAMME, P. BARKA, E.A. et al. *Burkholderia phytotirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1187–1192, 2005.
- SHAH, V. K.; BRILL, W. J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3249-3253, 1977.
- SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M.J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, v. 71, p. 91–109, 2017.
- SHARMA, P. K.; KUNDU, B. S.; DOGRA, R. C. Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. **Biotech. Adv.** Vol. 11, p. 741-779, 1993.
- SHEU, S. Y.; CHOU, J. H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; GROSS, E.; et al. *Burkholderia diazotrophica* sp nov isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **Int J Syst Evol Microbiol.**, vol. 63, p.435-441, 2012b.
- SHEU, S. Y.; CHOU, J. H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; GROSS, E.; et al. *Burkholderia symbiotica* sp nov isolated from root nodules of *Mimosa* spp native to north-east Brazil. **Int J Syst Evol Microbiol.**, vol. 62, p. 2272-2278, 2012a.
- SIMON, M.F.; GREYER, R.; DE QUEIROZ, L. P.; SÄRKINEN, T.E.; DUTRA, V.F.; HUGHES, C.E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 1201–1221. 2011.
- SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, 2001. 146 p.
- SPRENT, J.I.; ARDLEY, J.; JAMES, E.K. From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. **S.A.J. of Botany**, v. 89, p. 31–41, 2013. DOI: 10.1016/j.sajb.2013.06.011.
- SPRENT, J.I.; ARDLEY, J.; JAMES, E.K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, 2017. DOI: 10.1111/nph.14474.
- STETS, M. I.; PINTO, A. S. JR.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; GUIMARAES, V. F.; ALVES, A. C.; STEFFENS, M. B. R.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CRUZ, L. M. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, vol. 165, p. 167–174, 2013.
- SUZAKI, T.; YORO, E.; KAWAGUSHI, M. Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.**, v. 316, p. 1-48, 2015. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.004.

- TADRA-SFEIR, M. Z. **Caracterização funcional de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina**. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- TAK, A.; GEHLOT, A.T.; PATHAK, R.; SINGH, S.K. Species diversity of Rhizobia. In: HANSEN, A.P. et al. (Ed.). *Rhizobium* Biology and Biotechnology, **Soil Biology** 50. India: p. 215-245, 2017.
- TAULÉ, C.; ZABALETA, M.; MAREQUE, C.; PLATERO, R.; SANJURJO, L.; et al. New betaproteobacterial Rhizobium strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth. Brenan). **Appl Environ Microbiol.**, vol. 78, p. 1692-1700, 2012.
- TOZZI, A.M.G.A. (coord.). Mimosoideae In: Wanderley, M.G.L. et al. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 8, pp: 84-166, 2016.
- VALVERDE A, VELAZQUEZ E, GUTIERREZ C, CERVANTES E, VENTOSA A, IGUAL JM. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov. a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 1979–1983 2003.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; De VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 507–512, 2002.
- VANDAMME, P.; BRANDT, E. De; HOUF, K. et al. *Burkholderia humi* sp. nov., *Burkholderia choica* sp. nov., *Burkholderia telluris* sp. nov., *Burkholderia terrestris* sp. nov. and *Burkholderia udeis* sp. nov.: *Burkholderia glathei*-like bacteria from soil and rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4707-4718, 2013.
- VANEECHOUTTE, M.; KÄMPFER, P.; DE BAERE, T.; FALSEN, E.; VERSCHRAEGEN, G. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 317-327, 2004.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25 – 40, 1994.
- VIAL, L.; GROLEAU, M. C.; DEKIMPE, V.; DÉZIEL, E. *Burkholderia* Diversity and Versatility: An Inventory of the Extracellular Products. **J. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 17, p. 1407–1429, 2007.

- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (IPB. Handbook, 15).
- VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W. *et al.* Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological applications**, v. 7, n. 3, p. 737-750, 1997.
- ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.
- ZIEGLER, D.; MARIOTTI, A.; PFLÜGER, V.; SAAD, M.; VOGEL, G.; TONOLLA, M.; PERRET, X. *In Situ* Identification of Plant-Invasive Bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5: e37189, 2012.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE SOLOS E
ENGENHARIA AGRÍCOLA

Solicitante: DANIEL R. LAMMEL
 Endereço: BIOQUÍMICA-UFPR
 Cidade: Estado: PR

Tel: 8812-7945

Cep:

CERTIFICADO N 15137

LAUDO DE ANÁLISE DE SOLO - ROTINA

Data: 3/3/2015

Nº LAB	Identificação da Amostra	pH		Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	SB	T	mg/dm ³			C	S	V	m	Ca/Mg
		CaCl ₂	SMP								P	S	g/dm ³					
72297	1-(A1)	4,80	6,60	0,30	3,20	1,10	0,10	0,07	1,27	4,47	2,00	-	20,9	28	19	11,00		
72298	2-(A2)	4,90	6,90	0,20	2,50	1,90	0,50	0,12	2,52	5,02	1,50	-	18,3	50	7	3,80		
72299	3-(B)	4,30	5,60	0,70	7,10	3,30	0,70	0,23	4,23	11,33	11,80	-	92,3	37	14	4,71		
72300	4-(C)	4,20	7,10	0,90	2,20	0,40	0,10	0,05	0,55	2,75	1,60	-	6,8	20	62	4,00		
72301	5-(C2)	5,20	7,10	0,10	2,20	1,30	1,00	0,31	2,61	4,81	32,30	-	4,3	54	4	1,30		
72302	6-(E)	4,40	6,00	1,20	5,00	1,00	0,50	0,13	1,63	6,63	1,10	-	28,9	25	42	2,00		
72303	7-(G)	4,90	6,90	0,40	2,50	0,60	0,40	0,10	1,10	3,60	2,70	-	9,3	31	27	1,50		
72304	8-(I)	4,60	6,00	1,30	5,00	0,70	0,30	0,09	1,09	6,09	5,20	-	35,8	18	54	2,33		
72305	9-(K)	6,60	7,50	0,00	1,60	2,20	2,00	0,18	4,38	5,98	2,90	-	9,3	73	0	1,10		
72306	10-(L)	5,40	6,20	0,00	4,30	4,00	3,40	0,15	7,55	11,85	0,20	-	35,8	64	0	1,18		
72307	11-(M)	4,80	6,90	0,20	2,50	1,00	0,90	0,05	1,95	4,45	3,90	-	9,3	44	9	1,11		
72308	12-(P)	5,50	7,00	0,00	2,40	2,90	1,00	0,07	3,97	6,37	23,80	-	19,6	62	0	2,90		
72309	13-(Q)	5,90	7,40	0,00	1,80	2,50	1,10	0,10	3,70	5,50	27,00	-	28,9	67	0	2,27		
72310	15-(S)	4,90	6,40	0,60	3,70	1,50	1,20	0,12	2,82	6,52	2,70	-	42,9	43	18	1,25		

Resultados restritos às amostras recebidas. Neste laudo não constam recomendações.



Prof. Antonio C.V. Montez, PhD., *instit.* UFPR-98337
 Coord. Lab. de Fertilidade do Solo

ANEXO 1 – Laudo de Análise de Solo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE SOLOS E
ENGENHARIA AGRÍCOLA

Solicitante: DANIEL R. LAMMEL
Endereço: BIOQUÍMICA-UFPR
Cidade:

Tel: 8812-7945

Estado: PR Cep:

CERTIFICADO N 15137

LAUDO DE ANÁLISE DE SOLO - ROTINA

Data: 3/3/2015

Nº LAB	Identificação da Amostra	pH		Al ⁺³	H ⁺ +Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T	mg/dm ³			V	m	Ca/Mg
		CaCl ₂	SMP								P	S	C			
72311	16-(T)	5,00	7,50	0,30	1,60	0,60	0,90	0,07	1,57	3,17	8,10	-	10,6	50	16	0,67
72312	17-(A3)	4,40	5,50	2,30	7,80	0,70	0,10	0,05	0,85	8,65	1,80	-	60,9	10	73	7,00



Resultados restritos às amostras recebidas. Neste laudo não constam recomendações.

Prof. Antonio C.V. Motta, PhD, msc, UFPR-98337
Coord. Lab. de Fertilidade do Solo

ANEXO 2 – Legenda dos Apêndices 1, 2 E 3

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

APÊNDICE 1 – Classificação: Isolados Identificados X não Identificados

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
AA00214 (-)(C)	not reliable identification	1.265	not reliable identification	1.245
AA00225 (+++)(C)	AA00423	2.431	AA00524	2.356
AA00226 (+++)(C)	AA00422	2.391	AA00430	2.233
AA00232 (++)(C)	AA00422	2.268	AA00522	2.051
AA00233 (+++)(C)	AA00422	2.374	AA00423	2.27
AA00242 (+)(B)	AA00495	1.909	not reliable identification	0.966
AA00251 (-)(C)	not reliable identification	0.767	not reliable identification	0.738
AA00270 (++)(C)	AA00422	2.268	AA00423	2.268
AA00285 (+++)(C)	AA00422	2.43	AA00423	2.209
AA00288 (++)(C)	AA00422	2.221	AA00429	2.208
AA00304 (-)(C)	not reliable identification	1.638	not reliable identification	1.617
AA00306 (-)(C)	not reliable identification	1.054	not reliable identification	0.764
AA00307 (-)(C)	not reliable identification	1.045	not reliable identification	0.587
AA00308 (-)(C)	not reliable identification	0.732	not reliable identification	0.672
AA00313 (-)(C)	not reliable identification	1.019	not reliable identification	0.678
AA00314 (++)(C)	AA00422	2.299	AA00430	2.017
AA00315 (++)(C)	AA00431	2.207	AA00422	2.154
AA00317 (+)(B)	AA00533	1.742	not reliable identification	1.512
AA00324 (+++)(C)	AA00426	2.651	AA00432	2.626
AA00331 (+++)(C)	AA00432	2.354	AA00429	2.312

AA00333 (+++)(C)	AA00432	2.484	AA00519	2.449
AA00334 (+++)(C)	AA00425	2.568	AA00432	2.566
AA00337 (+++)(C)	AA00425	2.512	AA00423	2.416
AA00339 (+++)(C)	AA00432	2.479	AA00429	2.44
AA00340 (+++)(C)	AA00432	2.526	AA00434	2.505
AA00348 (+++)(C)	AA00426	2.669	AA00425	2.638
AA00349 (+++)(C)	AA00429	2.51	AA00425	2.495
AA00350 (+)(B)	AA00533	1.701	not reliable identification	1.448
AA00351 (-)(C)	not reliable identification	1.42	not reliable identification	0.871
AA00355 (-)(C)	not reliable identification	1.379	not reliable identification	1.285
AA00356 (-)(C)	not reliable identification	1.38	not reliable identification	1.07
AA00357 (-)(C)	not reliable identification	1.688	not reliable identification	1.636
AA00358 (-)(C)	not reliable identification	1.468	not reliable identification	0.909
AA00359 (+)(B)	AA00533	1.72	not reliable identification	1.575
AA00360 (-)(C)	not reliable identification	1.351	not reliable identification	1.219
AA00368 (-)(C)	not reliable identification	1.37	not reliable identification	1.079
AA00373 (+++)(C)	AA00423	2.315	AA00422	2.293
AA00374 (-)(C)	not reliable identification	1.534	not reliable identification	1.005
AA00374 (-)(C)	not reliable identification	1.422	not reliable identification	0.847
AA00375 (-)(C)	not reliable identification	1.343	not reliable identification	1.285
AA00376 (-)(C)	not reliable identification	1.542	not reliable identification	0.771

AA00377 (-)(C)	not reliable identification	1.37	not reliable identification	0.815
AA00378 (-)(C)	not reliable identification	1.287	not reliable identification	0.903
AA00380 (-)(C)	not reliable identification	0.695	not reliable identification	0.648
AA00381 (-)(C)	not reliable identification	1.543	not reliable identification	1.356
AA00382 (-)(C)	not reliable identification	1.15	not reliable identification	1.101
AA00400 (++)(C)	AA00429	2.089	AA00424	2.084
AA00401 (+++)(C)	AA00424	2.422	AA00429	2.413
AA00402 (++)(C)	AA00424	2.203	AA00429	2.163
AA00410 (++)(C)	AA00424	2.199	AA00430	2.095
AA00411 (++)(C)	AA00430	2.111	AA00424	1.94
AA00412 (+++)(C)	AA00432	2.31	AA00429	2.263
AA00416 (+++)(C)	AA00429	2.432	AA00430	2.397
AA00417 (+++)(C)	AA00424	2.403	AA00430	2.383
AA00417 (+++)(C)	AA00425	2.394	AA00429	2.39
AA00418 (+++)(C)	AA00430	2.38	AA00424	2.337
AA00419 (+++)(C)	AA00426	2.414	AA00429	2.388
AA00420 (+++)(C)	AA00424	2.376	AA00429	2.363

APÊNDICE 2 – Classificação: Isolados X Banco de Dados Biotyper

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: **Mimosa Project**
 Project Description: **Mimosa nodule isolates; Parana state**
 Project Owner: **Administrator**
 Project Creation Date/Time: **6/12/2015 9:39:45 AM**
 Project Analyte Count: **36**
 Project Type: **Development**
 Validation: **not present**
 Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
AA00214 (+) (B)	Burkholderia xenovorans	1.947	Burkholderia caledonica	1.924
AA00202 (-) (C)	not reliable identification	1.359	not reliable identification	1.317
AA00225 (-) (C)	not reliable identification	1.116	not reliable identification	1.109
AA00226 (-) (C)	not reliable identification	1.381	not reliable identification	1.147
AA00232 (-) (C)	not reliable identification	1.19	not reliable identification	1.198
AA00233 (-) (C)	not reliable identification	1.188	not reliable identification	1.158
AA00241 (+) (B)	Pseudomonas chlororaphis	1.882	Pseudomonas chlororaphis	1.792
AA00251 (++) (A)	Paenibacillus pabuli	2.156	Paenibacillus illinoisensis	1.94

AA00270 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.152</u>	not reliable identification	<u>1.149</u>
AA00285 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.222</u>	not reliable identification	<u>1.173</u>
AA00288 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.19</u>	not reliable identification	<u>1.126</u>
AA00304 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.248</u>	not reliable identification	<u>1.084</u>
AA00306 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.242</u>	not reliable identification	<u>1.178</u>
AA00307 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.183</u>	not reliable identification	<u>1.181</u>
AA00308 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.209</u>	not reliable identification	<u>1.163</u>
AA00313 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.318</u>	not reliable identification	<u>1.302</u>
AA00314 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.242</u>	not reliable identification	<u>1.163</u>
AA00315 (-)(C)	not reliable identification	<u>1.174</u>	not reliable identification	<u>1.133</u>
AA00317 (+)(A)	<i>Burkholderia caribensis</i>	<u>2.16</u>	not reliable identification	<u>1.533</u>
AA00350 (+)(A)	<i>Burkholderia caribensis</i>	<u>2.079</u>	not reliable identification	<u>1.544</u>
AA00351 (+)(A)	<i>Cupriavidus necator</i>	<u>2.138</u>	<i>Cupriavidus necator</i>	<u>1.972</u>
AA00355 (+)(A)	<i>Herbaspirillum luttense</i>	<u>2.038</u>	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	<u>1.993</u>
AA00356 (+)(B)	<i>Cupriavidus necator</i>	<u>1.951</u>	<i>Cupriavidus necator</i>	<u>1.767</u>
AA00357 (+)(A)	<i>Burkholderia caribensis</i>	<u>2.103</u>	not reliable identification	<u>1.523</u>
AA00358 (+)(A)	<i>Cupriavidus necator</i>	<u>2.059</u>	<i>Cupriavidus necator</i>	<u>1.843</u>
AA00359 (+)(A)	<i>Burkholderia caribensis</i>	<u>2.132</u>	not reliable identification	<u>1.44</u>

AA00358 (-)(C)	not reliable identification	1.383	not reliable identification	1.333
AA00373 (-)(C)	not reliable identification	1.239	not reliable identification	1.235
AA00374 (-)(C)	not reliable identification	1.654	not reliable identification	1.437
AA00375 (-)(C)	not reliable identification	1.631	not reliable identification	1.492
AA00376 (-)(C)	not reliable identification	1.371	not reliable identification	1.359
AA00377 (-)(C)	not reliable identification	1.61	not reliable identification	1.402
AA00378 (+)(B)	Cupriavidus necator	1.715	not reliable identification	1.604
AA00380 (-)(C)	not reliable identification	1.367	not reliable identification	1.325
AA00381 (+)(B)	Burkholderia carbensis	1.842	not reliable identification	1.611
AA00382 (-)(C)	not reliable identification	1.124	not reliable identification	1.116

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

APÊNDICE 3 – Classificação: Isolados X *Paraburkholderia phymatum* STM815 e *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424

15/11/2017

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: **todas contra as duas referencias da leilane**
 Project Description: Bruker Project Description
 Project Owner: MODERADOR
 Project Creation Date/Time: 15/11/2017 11:35:33
 Project Analyte Count: 144
 Project Type: Development
 Validation: not present
 Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
AA00214 (-)(C)	not reliable identification	0.734	not reliable identification	≤0
AA00225 (-)(C)	not reliable identification	0.597	not reliable identification	0.209
AA00226 (-)(C)	not reliable identification	0.548	not reliable identification	≤0
AA00340 (-)(C)	not reliable identification	0.221	not reliable identification	≤0
AA00348 (-)(C)	not reliable identification	≤0	not reliable identification	≤0
AA00349 (-)(C)	not reliable identification	≤0	not reliable identification	≤0
AA00350 (-)(C)	not reliable identification	1.465	not reliable identification	≤0
AA00351 (+)(B)	Cupriavidus taiwanensis	1.778	not reliable identification	0.505
AA00355 (-)(C)	not reliable identification	≤0	not reliable identification	≤0
AA00356 (+)(B)	Cupriavidus taiwanensis	1.787	not reliable identification	≤0
AA00357 (-)(C)	not reliable identification	1.228	not reliable identification	≤0

APÊNDICE 4 – Tabela Geral de Resultados das Coletas

ID strain atual	ID strain antiga	Ano	Solo	Sítio	Hospedeiro	ID BLAST 16S rRNA	ID sequenciamento 16rRNA	Localização geográfica	Estado	Local	Detalhes do local	Elevação	Latitude	Longitude
AA00001	nfn01	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42278	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00002	nfn02	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42020	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00003	nfn03	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42021	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00004	nfn04	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42022	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00005	nfn05	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42263	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00006	nfn06	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42023	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00007	nfn07	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42023	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00008	nfn08	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42023	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00009	nfn09	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas parafulva</i>	42265	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00010	nfn10	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Serratia sp. 14C-12</i>	42279	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00011	nfn11	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Serratia sp. KPS-14</i>	42280	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00012	nfn12	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42308	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00013	nfn13	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	42309	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00014	nfn14	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Serratia plymuthica</i>	42310	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00015	nfn15	2014	2	A2	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Serratia plymuthica</i>	42310	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1194	25°28'06.6"S	49°38'22.4"W
AA00016	nfn16	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Rhizobium lusitanum</i>	42322	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00017	nfn17	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	42323	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00018	nfn18	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	42324	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00019	nfn19	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	42325	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00020	nfn20	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Pseudomonas protegens</i>	42337	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00021	nfn21	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Pseudomonas protegens</i>	42338	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00022	nfn22	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Pseudomonas protegens</i>	42339	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W

AA00023	nfn23	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Pseudomonas protegens</i>	42341	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00024	nfn24	2014	3	B1	Mimosa gymnas Barneby	<i>Oerskovia turbata</i>	42342	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00025	nfn25	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>Oerskovia turbata</i>	42343	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00026	nfn26	2014	3	BA	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00027	nfn27	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>Bacillus megaterium</i>		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00028	nfn28	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00029	nfn29	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>Arthrobacter aurescens</i>		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00030	nfn30	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00031	nfn31	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00032	nfn32	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00033	nfn33	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>[Brevibacterium] frigiditolerans</i>		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00034	nfn34	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>Arthrobacter histidinovorans</i>		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00035	nfn35	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00036	nfn36	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00037	nfn37	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00038	nfn38	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00039	nfn39	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00040	nfn40	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00041	nfn41	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	42346	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00042	nfn42	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby	<i>Microbacterium arthrosphaerae</i>	42347	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00043	nfn43	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42412	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00044	nfn44	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00045	nfn45	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42414	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00046	nfn46	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42415	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00047	nfn47	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00048	nfn48	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00049	nfn49	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42417	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00050	nfn50	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42418	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W

AA00051	nfn51	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00052	nfn52	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby	<i>Bacillus thuringiensis Bt407</i>	42419	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00053	nfn53	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00054	nfn54	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	42420	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00055	nfn55	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00056	nfn56	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>			Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00057	nfn57	2014	8	I M.I.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00058	nfn58	2014	8	I M.I.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00059	nfn59	2014	8	I M.r.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00060	nfn60	2014	8	I M.I.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.	<i>Xanthomonas theicola</i>	42794	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00061	nfn61	2014	8	I M.r.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00062	nfn62	2014	8	I M.r.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00063	nfn63	2014	8	I M.r.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00064	nfn64	2014	8	I M.I.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00065	nfn65	2014	8	I M.I.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00066	nfn66	2014	8	I M.I.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00067	nfn67	2014	3	B1	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby	<i>Pseudomonas protegens</i>	42797	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00068	nfn68	2014	3	B1	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00069	nfn69	2014	3	B1	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby			Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00070	nfn70	2014	4	C1	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var. extratropica Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00071	nfn71	2014	4	C1	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var. extratropica Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00072	nfn72	2014	8	I M.r.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00073	nfn73	2014	8	I M.r.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00074	nfn74	2014	8	I M.r.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.	<i>Pseudomonas baetica</i>		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00075	nfn75	2014	8	I M.I.	<i>Mimosa lanata</i> Benth.	<i>Xanthomonas theicola</i>	42281	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00076	nfn76	2014	3	B1	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby	<i>Pseudomonas putida</i>		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00077	nfn77	2014	10	L	<i>Mimosa regnellii</i> var. <i>Exuta</i> Barneby	<i>Pseudomonas putida</i>	42283	Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	928	25°09'16.9"S	50°03'21.6"W
AA00078	nfn78	2014	10	L	<i>Mimosa regnellii</i> var. <i>Exuta</i> Barneby			Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	928	25°09'16.9"S	50°03'21.6"W

AA00079	nfn79	2014	10	L	Mimosa regnellii var. Exuta Barneby	<i>Burkholderia terricola</i>	42285	Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	928	25°09'16.9"S	50°03'21.6"W
AA00080	nfn80	2014	10	L	Mimosa regnellii var. Exuta Barneby	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	42286	Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	928	25°09'16.9"S	50°03'21.6"W
AA00081	nfn81	2014	10	L	Mimosa regnellii var. Exuta Barneby			Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	928	25°09'16.9"S	50°03'21.6"W
AA00082	nfn82	2014	10	L	Mimosa regnellii var. Exuta Barneby	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	42287	Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	928	25°09'16.9"S	50°03'21.6"W
AA00083	nfn83	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00084	nfn84	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus pabuli</i>		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00085	nfn85	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00086	nfn86	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00087	nfn87	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus pabuli</i>		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00088	nfn88	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00089	nfn89	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00090	nfn90	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00091	nfn91	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00092	nfn92	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00093	nfn93	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00094	nfn94	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00095	nfn95	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00096	nfn96	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00097	nfn97	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00098	nfn98	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart			Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00099	nfn99	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart			Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00100	nfn100	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart			Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00101	nfn101	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart			Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00102	nfn102	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00103	nfn103	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00104	nfn104	2014	9	K	Mimosa flocculosa Burkart			Ponta Grossa	PR	Embrapa road	near a dirt road	826	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W
AA00105	nfn105	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00106	nfn106	2014		J	Mimosa pilulifera var. pseudincana (Burkart) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	974	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W

AA00107	nfn107	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00108	nfn108	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00109	nfn109	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00110	nfn110	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00111	nfn111	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00112	nfn112	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00113	nfn113	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00114	nfn114	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00115	nfn115	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00116	nfn116	2014	11	M	Mimosa paranapiacabae Barneby		Ponta Grossa	PR	Passo do Pupo	near a dirt road	1023	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W
AA00117	nfn117	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00118	nfn118	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00119	nfn119	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00120	nfn120	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00121	nfn121	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00122	nfn122	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00123	nfn123	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00124	nfn124	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00125	nfn125	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00126	nfn126	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00127	nfn127	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00128	nfn128	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00129	nfn129	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Pseudomonas baetica</i>	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00130	nfn130	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00131	nfn131	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Pseudomonas baetica</i>	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00132	nfn132	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00133	nfn133	2014		O	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00134	nfn134	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00135	nfn135	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W

AA00136	nfn136	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00137	nfn137	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00138	nfn138	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00139	nfn139	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00140	nfn140	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00141	nfn141	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00142	nfn142	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00143	nfn143	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00144	nfn144	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00145	nfn145	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00146	nfn146	2014	15	S	<i>Mimosa pudica</i> var. <i>Hispida</i>		Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00147	nfn147	2014	16	T	<i>Machaerium stipitatum</i>		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near the beach	3	25°34'36.7"S	48°21'00.8"W
AA00148	nfn148	2014	16	T	<i>Machaerium stipitatum</i>		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near the beach	3	25°34'36.7"S	48°21'00.8"W
AA00149	nfn149	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00150	nfn150	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00151	nfn151	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00152	nfn152	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00153	nfn153	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00154	nfn154	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00155	nfn155	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.		Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00156	nfn156	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00157	nfn157	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00158	nfn158	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1203	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00159	nfn159	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby	<i>Bacillus simplex</i>	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00160	nfn160	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00161	nfn161	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00162	nfn162	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00163	nfn163	2014	3	B2	<i>Mimosa gymnas</i> Barneby	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W

AA00164	nfn164	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00165	nfn165	2014	3	B2	Mimosa gymnas Barneby		Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	near a dirt road	1204	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W
AA00166	nfn166	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00167	nfn167	2014	4	C1	Mimosa dryandroides Taubert var. extratropica Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	966	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00168	nfn168	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00169	nfn169	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00170	nfn170	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00171	nfn171	2014	13	Q	<i>Mimosa bimucronata</i>	<i>Cedecea davisae</i>	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	23	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00172	nfn172	2014	8	I M.I.	Mimosa lanata Benth.		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00173	nfn173	2014	8	I M.I.	Mimosa lanata Benth.		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00174	nfn174	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00175	nfn175	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00176	nfn176	2014	7	G	Mimosa dolens var. Foliolosa (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	971	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00177	nfn177	2014	8	I M.r.	Mimosa lanata Benth.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a river	973	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00178	nfn178	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Bacillus megaterium</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00179	nfn179	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Bacillus megaterium</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00180	nfn180	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus pabuli</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00181	nfn181	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby	<i>Paenibacillus pabuli</i>	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00182	nfn182	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00183	nfn183	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00184	nfn184	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00185	nfn185	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00186	nfn186	2014	6	E	Mimosa dolens var. latifolia (Benth.) Barneby		Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00187	nfn187	2014		N	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00188	nfn188	2014		O	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00189	nfn189	2014		O	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00190	nfn190	2014		O	Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00191	nfn191	2014	129		Mimosa pseudocallosa Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W

AA00192	nfn192	2014		124	<i>Mimosa pseudocallosa</i> Burkart			Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00193	nfn193	2014	6	89	<i>Mimosa dolens</i> var. <i>Latifolia</i> (Benth.) Barneby			Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	near a dirt road	969	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W
AA00194	nfn194	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>			Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00195	nfn195	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>			Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00196	nfn196	2014	12	P	<i>Mimosa pudica</i>			Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00197	nfn197	2014		V	<i>Dalbergia ecastaphylla</i> (L.) Taub.			Pontal do Parana	PR	Pontal do Sul	near a mangrove	0	25°34'05.2"S	48°21'05.9"W
AA00200	nfn10.1	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44620	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00201	nfn10.2	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44436	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00202	nfn10.3	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44437	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00203	nfn10.4	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44438	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00204	nfn10.5.1	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44439	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00205	nfn10.5.2	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44440	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00206	nfn10.5.3	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44441	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00207	nfn10.6.1	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44442	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00208	nfn10.6.2	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>		44443	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00209	nfn10.7	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44444	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00210	nfn10.8	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44708	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00211	nfn10.9	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44707	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00212	nfn10.10	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44706	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00213	nfn10.11	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379G8	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00214	nfn10.11.2	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44705	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00215	nfn10.12	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379H8	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00216	nfn10.13	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	46379A9	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00217	nfn10.15.1	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44697	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00218	nfn10.15.2	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44696	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00219	nfn10.16	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	44695	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00220	nfn10.17	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	43164	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00221	nfn10.18	2015			<i>Mimosa piscatorum</i>	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	43165	Garuva	SC	Campos de Quiriní	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W

AA00222	nfn11.10	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44712	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00223	nfn11.11	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44709	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00224	nfn11.12	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379B7	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00225	nfn11.13	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia nodosa</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00226	nfn11.14	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	46379C8	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00227	nfn11.15	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia oxyphila</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00228	nfn11.16	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379E8	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00229	nfn11.17	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379F8	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00230	nfn11.18	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	43166	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00231	nfn11.19	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	43167	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00232	nfn11.3	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia graminis</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00233	nfn11.4	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia humi</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00234	nfn11.5	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379B3	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00235	nfn11.8	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379E3	Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00236	nfn11.9	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia oxyphila</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	near a mining area	1538	26° 1'46.36"S	48°57'33.62" W
AA00237	nfn2.1	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas poae</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00238	nfn2.10	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	43149	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00239	nfn2.11	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas koreensis</i>	44715	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00240	nfn2.12	2015	Mimosa sp.	<i>Burkholderia humi</i>	43151	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00241	nfn2.19	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00242	nfn2.21	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas endophytica</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00243	nfn2.5	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00244	nfn2.6	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00245	nfn2.7	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00246	nfn2.9	2015	Mimosa sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	43148	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00247	nfn3.1	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	44714	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00248	nfn3.10	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379A11	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00249	nfn3.11	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379B11	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W

AA00250	nfn3.12	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Microbacterium azadirachtae</i>	44690	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00251	nfn3.15	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Paenibacillus tundrae</i>	44689	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00252	nfn3.17	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00253	nfn3.21	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Dyella terrae</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00254	nfn3.24	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Paenibacillus tundrae</i>	44694	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00255	nfn3.32	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	44614	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00256	nfn3.34	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	44616	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00257	nfn3.35	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	44617	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00258	nfn3.37	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	44618	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00259	nfn3.39	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	44619,45	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00260	nfn3.40	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>		44704	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00261	nfn3.41	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>		44703	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00262	nfn3.8	2015	<i>Mimosa scabrella/lanata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00263	nfn4.10	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	46379A12	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00264	nfn4.11	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Enterobacter asburiae</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00265	nfn4.15	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Burkholderia humi</i>	43152	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00266	nfn4.16	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	43153	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00267	nfn4.2	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379C11	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00268	nfn4.22	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Burkholderia humi</i>	44717	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00269	nfn4.3	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	46379D11	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 2'24.50"S	48°57'41.62" W
AA00270	nfn6.1	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379D10	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00271	nfn6.10	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379G2	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00272	nfn6.12	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379D5	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00273	nfn6.13	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379A10	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00274	nfn6.14	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379B10	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00275	nfn6.15	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379C10	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00276	nfn6.17	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379E10	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00277	nfn6.18	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379F10	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26° 1'45.87"S	48°57'33.62" W

AA00278	nfn6.19	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00279	nfn6.2	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44679	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00280	nfn6.20	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44716	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00281	nfn6.3	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44680	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00282	nfn6.4	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44681	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00283	nfn6.5	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44682	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00284	nfn6.6	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44683	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00285	nfn6.7	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia ferrariae</i>	44684	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00286	nfn6.8	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44685	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00287	nfn6.9	2015	<i>Mimosa hirsutula</i>	<i>Burkholderia ferrariae</i>	44686	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00288	nfn7.1	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44426	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00289	nfn7.10	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	46379C9,44691	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00290	nfn7.11	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44432	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00291	nfn7.12	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44433	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00292	nfn7.13	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379E9	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00293	nfn7.14	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44435	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00294	nfn7.15	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379G9	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00295	nfn7.16	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379H9	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00296	nfn7.2	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44427	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00297	nfn7.3	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44428	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00298	nfn7.4	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379G4	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00299	nfn7.5	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44692	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00300	nfn7.6	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44429	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00301	nfn7.7	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44430	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00302	nfn7.8	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia mimosarum</i>	44431	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00303	nfn7.9	2015	<i>Mimosa</i> sp.	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	46379B9	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00304	nfn9.1	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379A4	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00305	nfn9.10	2015	<i>Mimosa murex</i> Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44446	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W

AA00306	nfn9.11	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44447	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00307	nfn9.12	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44448	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00308	nfn9.14	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44449	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00309	nfn9.15	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44450	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00310	nfn9.16	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44451	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00311	nfn9.17	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Variovorax sp.</i>	44452	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00312	nfn9.18	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44453	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00313	nfn9.19	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Rhizobium jaguaris</i>	44454	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00314	nfn9.2	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379D4	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00315	nfn9.3	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia oxyphila</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00316	nfn9.5	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379D6	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00317	nfn9.6	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia nodosa</i>		Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00318	nfn9.7	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379F6	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00319	nfn9.9	2015	Mimosa murex Barneby	<i>Sphingomonas sp.</i>	44445	Garuva	SC	Campos de Quiriri	Alto Quiriri Farm	1538	26°1'45.87"S	48°57'33.62" W
AA00320	nfn_b1.3 2	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00321	nfn_b1.3 3	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00322	nfn_b1.3 4	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00323	nfn_b1.3 5	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00324	nfn_b1.3 6	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00325	nfn_b2.3 7	2016	Mimosa congestifolia Burkart			Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00326	nfn_b2.3 8	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379A3	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00327	nfn_b2.3 9	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00328	nfn_b2.4 0	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00329	nfn_b2.4 1	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00330	nfn_c1.5 2	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00331	nfn_c1.5 3	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00332	nfn_c1.5 4	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00333	nfn_c1.5 5	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			

AA00334	nfn_c1.5 6	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia ferrariae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00335	nfn_c2.5 7	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia ferrariae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00336	nfn_c2.5 8	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379A4	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00337	nfn_c2.5 9	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00338	nfn_c2.6 0	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00339	nfn_c2.6 1	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00340	nfn_m1.4 2	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00341	nfn_m1.4 3	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00342	nfn_m1.4 4	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379A5	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00343	nfn_m1.4 5	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia ferrariae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00344	nfn_m1.4 6	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00345	nfn_m2.4 7	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00346	nfn_m2.4 8	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00347	nfn_m2.4 9	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00348	nfn_m2.5 0	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00349	nfn_m2.5 1	2016	Mimosa congestifolia Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain			
AA00350	nfn_p1	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45145	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00351	nfn_p10	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45062	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00352	nfn_p11	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45063	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00353	nfn_p12	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45064	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00354	nfn_p13	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45065	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00355	nfn_p14	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	45066	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00356	nfn_p15	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45067	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00357	nfn_p16	2015	<i>Mimosa pudica</i>			Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00358	nfn_p17	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45068	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00359	nfn_p18	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45069	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00360	nfn_p19	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	45070	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00361	nfn_p2	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45119	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W

AA00362	nfn_p20	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45146	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00363	nfn_p21	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45120	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00364	nfn_p22	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45121	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00365	nfn_p23	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45122	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00366	nfn_p24	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45123	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00367	nfn_p25	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45124	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00368	nfn_p26	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45125	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00369	nfn_p27	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45126	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00370	nfn_p28	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45127	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00371	nfn_p29	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45128	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00372	nfn_p3	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45147	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00373	nfn_p30	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>		Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00374	nfn_p4	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45059	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00375	nfn_p5	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45148	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00376	nfn_p6	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45149	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00377	nfn_p7	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45150	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00378	nfn_p8	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	45060	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00379	nfn_p9	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45061	Morretes	PR	Former Gerds farm	near a dirt road	22	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W
AA00380	nfn_s1	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	45130	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00381	nfn_s10	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45129	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00382	nfn_s11	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	45138	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00383	nfn_s12	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	45139	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00384	nfn_s13	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	45140	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00385	nfn_s14	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	45141	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00386	nfn_s15	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	45142	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00387	nfn_s16	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	45143	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00388	nfn_s17	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia mimosarum</i>	45144	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00389	nfn_s2	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	45131	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W

AA00390	nfn_s4	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	45133	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00391	nfn_s5	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	45134	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00392	nfn_s7	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45136	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00393	nfn_s8	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45137	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00394	nfn_s9	2015	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Burkholderia caribensis</i>	45058	Paranagua	PR	Morro do Ingles	pasture	50	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W
AA00395	nfn_z4_1.62	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart			Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00396	nfn_z4_1.63	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia ferrariae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00397	nfn_z4_1.64	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia ferrariae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00398	nfn_z4_1.65	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart			Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00399	nfn_z4_1.66	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia ferrariae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00400	nfn_z4_2.67	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00401	nfn_z4_2.68	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart			Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00402	nfn_z4_2.69	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart			Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00403	nfn_z4_2.70	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	46379A2	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00404	nfn_z4_2.71	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00405	nfn_z5_1.72	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart			Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00406	nfn_z5_1.73	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia ferrariae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00407	nfn_z5_1.74	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00408	nfn_z5_1.75	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00409	nfn_z5_1.76	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00410	nfn_z5_2.77	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00411	nfn_z5_2.78	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00412	nfn_z5_2.79	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00413	nfn_z5_2.80	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00414	nfn_z5_2.81	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00415	nfn_z6.82	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Paenibacillus castaneae</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00416	nfn_z6.83	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00417	nfn_z6.84	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W

AA00418	nfn_z6.8 5	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00419	nfn_z6.8 6	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00420	nfn_z6.8 7	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00421	nfn_z6.8 8	2016	Mimosa pseudocallosa Burkart	<i>Burkholderia mimosarum</i>	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1359	25°30'55"S	48°58'53"W
AA00422	nfn_p1.1	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00423	nfn_p1.2	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00424	nfn_p1.3	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00425	nfn_p1.4	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00426	nfn_p2.1	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00427	nfn_p2.2	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00428	nfn_p2.3	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00429	nfn_p2.4	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00430	nfn_p2.5	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00431	nfn_p2.6	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00432	nfn_p3.1	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00433	nfn_p3.2	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00434	nfn_p3.3	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00435	nfn_p3.4	2017	Mimosa congestifolia Burkart		Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00436	BNU5.1	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00437	BNU5.2A	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00438	BNU5.3A	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00439	BNU5.4	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00440	BNU5.4A	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00441	BNU8.5A	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00442	BNU2.2A	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00443	BNU2.1	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00444	BNU7.1A	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00445	BNU7.1B	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00446	BNU8.4	2017	<i>Mimosa pudica</i>		Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W

AA00447	BNU4.1	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	station aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00448	BNU6.2A	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00449	BNU3.1	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00450	BNU8.2	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00451	BNU8.1	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00452	BNU1.2	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00453	BNU6.3A	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00454	BNU6.2B	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00455	BNU6.1A	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00456	BNU1.4	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00457	BNU8.3	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00458	BNU8.4	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00459	BNU1.3	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00460	BNU1.1	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00461	BNU6.6	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00462	BNU6.8	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00463	BNU6.5A	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00464	BNU6.4B	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00465	BNU6.4A	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00466	BNU6.7	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00467	BNU6.3B	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00468	nfn_s11	2017	<i>Mimosa pudica</i>	Blumenau	SC	Bus station	aside bus station		26°53'39"S	49°4'19"W
AA00469	nfn2.1.1	2017	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio		987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00470	nfn2.1.2	2017	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio		987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00471	nfn2.2.1	2017	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio		987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00472	nfn2.3.1	2017	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio		987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00473	nfn2.4.1	2017	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio		987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00474	nfn5.1.1	2017	<i>Mimosa dryandroides</i> Taubert var.	Palmeira	PR	Recanto do		987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W

AA00475	nfn5.2.1	2017	Extratropica Barneby Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Papagaio Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00476	nfn5.3.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00477	nfn6.1.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00478	nfn6.2.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00479	nfn6.3.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00480	nfn7.1.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00481	nfn7.2.2	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00482	nfn7.2.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00483	nfn7.3.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00484	nfn7.4.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00485	nfn7.5.1	2017	Mimosa dryandroides Taubert var. Extratropica Barneby	Palmeira	PR	Recanto do Papagaio	987	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W
AA00486	nfn1.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00487	nfn1.2	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00488	nfn1.3	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00489	nfn1.4	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00490	nfn3.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00491	nfn3.2	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00492	nfn3.3	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00493	nfn3.4	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00494	nfn3.5	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00495	nfn3.6	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00496	nfn3.7	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00497	nfn4.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00498	nfn4.2	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00499	nfn4.2.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00500	nfn4.3	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00501	nfn4.3.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00502	nfn4.4	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã	1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W

AA00503	nfn.5.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	Purunã São Luiz do Purunã		1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00504	nfn.5.2	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã		1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00505	nfn.5.3	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã		1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00506	nfn.5.3.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã		1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00507	nfn.6.1	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã		1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00508	nfn.6.2	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã		1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00509	nfn.6.3	2017	Mimosa dolens (to be confirmed)	Balsa Nova	PR	São Luiz do Purunã		1172	25o28'10.7"S	49o38'38.1"W
AA00510	nfn.1.1	2017	Mimosa sp. (to be confirmed)	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha		1038	25°17'57.8"S	49°28'52.3"W
AA00511	nfn.1.2	2017	Mimosa sp. (to be confirmed)	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha		1038	25°17'57.8"S	49°28'52.3"W
AA00512	nfn.2.1	2017	Mimosa sp. (to be confirmed)	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha		1038	25°17'57.8"S	49°28'52.3"W
AA00513	nfn.2.2	2017	Mimosa sp. (to be confirmed)	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha		1038	25°17'57.8"S	49°28'52.3"W
AA00514	nfn.3.1	2017	<i>Mimosa scabrella</i>	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha		1083	25°17'59.6"S	49°29'45.5"W
AA00515	nfn.3.2	2017	<i>Mimosa scabrella</i>	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha		1083	25°17'59.6"S	49°29'45.5"W
AA00516	nfn.3.3	2017	<i>Mimosa scabrella</i>	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha		1083	25°17'59.6"S	49°29'45.5"W
AA00517	nfn.4.1	2017	<i>Mimosa scabrella</i>	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha	Lago da pedreira	812	25°19'27.9"S	49°27'17.0"W
AA00518	nfn.4.2	2017	<i>Mimosa scabrella</i>	Campo Magro	PR	Trilha do Morro da Palha	Lago da pedreira	812	25°19'27.9"S	49°27'17.0"W
AA00519	MC1	2017	<i>Mimosa congestifolia</i> Burkart	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00520	MC2	2017	<i>Mimosa congestifolia</i> Burkart	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00521	MC3	2017	<i>Mimosa congestifolia</i> Burkart	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00522	MC4	2017	<i>Mimosa congestifolia</i> Burkart	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00523	MC5	2017	<i>Mimosa congestifolia</i> Burkart	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00524	MC6	2017	<i>Mimosa congestifolia</i> Burkart	Piraquara	PR	Morro do canal	mountain	1313	25°30'52.6"S	48°59'16.8"W
AA00525	Pap2-1	2017	<i>Mimosa strobiliflora</i> (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00526	Pap2-2	2017	<i>Mimosa strobiliflora</i> (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00527	Pap2-3	2017	<i>Mimosa strobiliflora</i> (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00528	Pap2-4	2017	<i>Mimosa strobiliflora</i> (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W

AA00529	Pap2-5	2017	Mimosa strobiliflora (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	bridge River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00530	Pap2-5.1	2017	Mimosa strobiliflora (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00531	Pap2-6	2017	Mimosa strobiliflora (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00532	Pap2-7	2017	Mimosa strobiliflora (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00533	Pap2-7.1	2017	Mimosa strobiliflora (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00534	Pap2-8	2017	Mimosa strobiliflora (to be confirmed)	Porto Amazonas	PR	Iguassu river	River bank nearby railroad bridge	787	25°32'41.1"S	49°52'41.8"W
AA00535	Pap1-1	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00536	Pap1-1.1	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00537	Pap1-2	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00538	Pap1-2.1	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00539	Pap1-3	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00540	Pap1-3.1	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00541	Pap1-4	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00542	Pap1-5	2017	Mimosa sp. (to be confirmed; possibly M. scabrella)	Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W

AA00543	Pap1-5.1	2017		Mimosa sp. (to be confirmed; possibly <i>M. scabrella</i>)		Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	and hydroelectric plant gate Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W
AA00544	Pap1-6	2017		Mimosa sp. (to be confirmed; possibly <i>M. scabrella</i>)		Porto Amazonas	PR	Salto Caiacangá Hydroelectric	Dirt road near cement bridge and hydroelectric plant gate	769	25°32'51.54"S	49°49'21.02" W