UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA SABADIN MOREIRA

DIVERSIDADE E ANALISE DE BACTÉRIAS NODULANTES DE MIMOSA SPP. NO ESTADO DO PARANÁ E SANTA CATARINA

CURITIBA

2022

FERNANDA SABADIN MOREIRA

DIVERSIDADE E ANALISE DE BACTÉRIAS NODULANTES DE MIMOSA SPP. NO ESTADO DO PARANÁ E SANTA CATARINA

Dissertação apresentada ao curso de pósgraduação de Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Drº Leonardo Magalhães Cruz

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Moreira, Fernanda Sabadin.

Diversidade e análise de bactérias nodulantes de Mimosa spp. no Estado do Paraná e Santa Catarina. / Fernanda Sabadin Moreira. – Curitiba, 2022. 1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Leonardo Magalhães Cruz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Betaproteobacteria. 2. Rizóbio. 3. Mimosa. 4. Leguminosa. 5. Bactérias. 6. Plantas. I. Título. II. Cruz, Leonardo Magalhães. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA SABADIN MOREIRA** intitulada: **DIVERSIDADE E ANALISE DE BACTÉRIAS NODULANTES DE Mimosa spp. NO ESTADO DO PARANÁ E SANTA CATARINA**, sob orientação do Prof. Dr. LEONARDO MAGALHÃES CRUZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 24 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica 09/03/2022 17:29:33.0 LEONARDO MAGALHÃES CRUZ Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 12/04/2022 04:21:16.0 DANIEL RENATO LAMMEL Avaliador Externo (FREIE UNIVERSITAT BERLIN)

Assinatura Eletrônica 04/04/2022 10:52:14.0 ROSE ADELE MONTEIRO Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

e insira o codigo 161209

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela imensurável ajuda em todos os momentos e por poderem me proporcionar todas as oportunidades que tive, me dando apoio de todas as formas e sendo a melhor família que poderia ter. Às minhas avós, principalmente vó Nena, por sempre estarem comigo me dando força e me confortando, me ajudando e me dando muito amor e proteção.

Ao meu namorado, que compartilhou comigo cada momento durante estes dois anos, desde os mais difíceis até os mais felizes, me guiando e me dando força, apoio e sabedoria, e me amadurecendo para todos os desafios por vir.

Aos meus amigos e colegas de graduação e pós-graduação, os quais me proporcionaram imensa troca de conhecimento e me fizeram companhia durante estes anos.

A todos os técnicos de laboratório, principalmente D. Rose e Valter, pela ajuda imensurável na execução deste projeto, e a todos os colaboradores do setor de Ciências Biológicas, que fazem ser possível o desenvolvimento de projetos de pesquisa destro do setor e da universidade.

Ao meu orientador, professor Dr. Leonardo Magalhães Cruz, que me guia academicamente desde 2017, por meio de iniciações científicas, monografia e agora mestrado, pelo grande aprendizado e conhecimento recebidos, por toda a dedicação e atenção durante estes anos de orientação.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a minha jornada acadêmica e científica, professores e orientadores da graduação.

A CAPES, CNPQ e agências financiadoras, pelo apoio financeiro. A Pósgraduação em Ciências (Bioquímica), pela oportunidade e a todos os docentes e discentes que participam e já participaram desta pós e do departamento.

A Universidade Federal do Paraná, por todas as oportunidades e imenso crescimento pessoal e profissional, que só foi possível garças à esta instituição.

RESUMO

Microrganismos diazotróficos são responsáveis pela maior parte da assimilação de nitrogênio nos ecossistemas, reduzindo nitrogênio a amônio por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN). Por ser um grupo polifilético, são encontrados entre vários taxa de arqueias e bactérias, dentre elas, Alfa e Betaproteobactérias, capazes de interagir simbioticamente com a família das leguminosas (Fabaceae), sendo chamadas de alfa-rizóbios e beta-rizóbios, respectivamente. Beta-rizóbios estão majoritariamente restritos a interações com o gênero Mimosa, um legume arbóreo nativo das américas do Sul e Central, com espécies endêmicas no Brasil. Apenas um terço dos legumes conhecidos tem suas bactérias simbiontes descritas e, assim, a detecção e o estudos de novos simbiontes se vê extremamente necessárias para que a taxonomia destes microrganismos seja esclarecida. A identificação e caracterização de novas espécies de rizóbios é um ponto chave para entender a diversidade existente de procariotos capazes de interagir simbioticamente com legumes. Sendo assim, betaproteobactérias foram isoladas de nódulos de Mimosa spp. amostradas nos estados do Paraná e Santa Catarina, na região sul brasileira. Um total de 189 isolados foram amostrados de nódulos de 20 diferentes espécies de Mimosa. A identificação taxonômica dos isolados a partir de sequências do gene 16S rRNA mostrou a presença dos gêneros Rhizobium, Bradyrhizobium, Herbaspirillum, Cupriavidus e Paraburkholderia. O agrupamento dos isolados a partir das sequências também demonstrou que 5% dos grupos foram formados apenas por isolados e não puderam ser identificados taxonomicamente por comparação com espécies referência, sendo consideradas potenciais novas espécies dos gêneros Paraburkholderia e Cupriavidus. Para confirmação das novas espécies, análises de diversidade, taxonomia polifásica e ensaios de nodulação foram realizadas, além da submissão do DNA genômico dos isolados para sequenciamento, buscando uma análise taxonômica de maior resolução a partir da seguência genômica total e de genes marcadores essenciais. Como resultado, três novas espécies de beta-rizóbios puderam ser confirmadas, pertencentes ao gênero Paraburkholderia. Paraburkholderia spA, Paraburkholderia spC e Paraburkholderia spD são aqui propostas e descritas genética e fenotipicamente, e caracterizadas como novas espécies de betaproteobactérias nodulantes de espécies de *Mimosa* amostradas no Paraná e Santa Catarina.

Palavras-chave: Betaproteobactérias. Rizóbios. Mimosa spp. Leguminosas. Interação planta-bactéria.

ABSTRACT

Diazotrophic microorganisms are responsible for most of the nitrogen assimilation in ecosystems, reducing nitrogen to ammonium through biological nitrogen fixation (BNF). As a polyphyletic group, they are found among several taxa of archaea and bacteria, and among them, Alpha and Betaproteobacteria, capable of symbiotically interacting with the legume family (Fabaceae), being called alpha-rhizobia and betarhizobia, respectively. Beta-rhizobia are mostly restricted to interactions with the genus Mimosa, a legume native to South and Central America, with endemic species in Brazil. Only a third of the known legumes have their symbiotic bacteria described and, thus, the detection and study of new symbionts is extremely necessary for the taxonomy of these microorganisms to be clarified. Identification and characterization of new species of rhizobia is a key point to understand the existing diversity of prokaryotes capable of symbiotically interacting with these plants. Therefore, betaproteobacteria were isolated from *Mimosa* spp. sampled in the states of Paraná and Santa Catarina, in the southern region of Brazil. A total of 189 isolates were sampled from nodules of 20 different species of Mimosa. The taxonomic identification of the isolates trough 16S rRNA gene sequences showed the presence of the genera Rhizobium, Bradyrhizobium, Herbaspirillum, Cupriavidus and Paraburkholderia. The clustering of isolates from the sequences also showed that 5% of the groups were formed by only isolates and could not be taxonomically identified by comparison with reference species, being considered potential new species of the genera Paraburkholderia and Cupriavidus. To confirm the new species, diversity analysis, polyphasic taxonomy and nodulation assays were performed, in addition to the submission of genomic DNA of the isolates for sequencing, seeking a higher taxonomic resolution from the total genomic sequence and essential marker genes. As a result, three new species of beta-rhizobia could be confirmed, belonging to the genus Paraburkholderia. Paraburkholderia spA, Paraburkholderia spC and Paraburkholderia spD are here proposed and described genetically and phenotypically and characterized as new species of nodulating betaproteobacteria from Mimosa species sampled in Paraná and Santa Catarina.

Key-words: Betaproteobacteria. Rhizobia.. Mimosa spp. Legumes. Plant-bacteria interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diagrama da distribuição de rizóbios dentro das classes alfa e betaproteobactéria.

FIGURA 2 – Sinalização entre hospedeiro e microrganismos simbiontes, ilustrando o papel dos flavonoides da ativação de genes *nod* de rizóbios na colonização das raízes da leguminosa.

FIGURA 3 – Distribuição dos principais gêneros de rizóbios dentro da filogenia das Proteobactérias.

FIGURA 4 – Filogenia do gênero Burkholderia/Paraburkholderia.

FIGURA 5 – Sistema de cultivo de *Mimosa pudica* em condições estéreis para ensaios de nodulação.

FIGURA 6 – Local de amostragem de plantas de *Mimosa* spp. coletas por Silva (2018) e Moreira (2018) nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil.

FIGUA 7 – Árvore filogenética baseada nos alinhamentos concatenados dos genes *16S rRNA* e *recA* amplificados de estirpes isoladas e estirpes referência de rizóbios.

FIGURA 8 – Árvore filogenética¹ do gene *nifH* para as estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes referência de rizóbios.

FIGURA 9 – Árvore filogenética¹ do gene *nodC* para as estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes referência de rizóbios.

FIGURA 10 – Filogenia comparativa entre os genes *nifH* e *nodC* de para as estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes referência de rizóbios.

FIGURA 11 - Exemplificação do crescimento das estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. para ensaios fenotípicos.

FIGURA 12 – Crescimento ótimo em diferentes temperaturas para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

FIGURA 13 – Crescimento ótimo em diferentes concentrações de NaCI para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

FIGURA 14 – Crescimento ótimo em diferentes pH para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

FIGURA 15 – Crescimento em diferentes fontes de carbono para estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp.

FIGURA 16 – Crescimento em diferentes fontes de carbono¹ para estirpes para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

FIGURA 17 – Ensaios de motilidade em NFB malato 0,25% ágar para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

FIGURA 18 – Promoção do crescimento vegetal em ensaio de nodulação em plantas de *M. pudica* inoculadas com estirpes isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Utilização de antibióticos para testes de resistência à antibióticos com estirpes selecionadas de nódulos de *Mimosa* spp.

TABELA 2 – Composição do meio BD utilizado para irrigação em testes de nodulação com estirpes selecionadas de nódulos de *Mimosa* spp.

TABELA 3 – Plantas de *Mimosa* spp. amostradas por Silva (2018) e Moreira (2018) nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil.

TABELA 4 – Grupos baseados em sequências de *16S rRNA* de estirpes isoladas a partir dos nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes tipo referência (NCBI) para o gênero *Paraburkholderia*.

TABELA 5 – Características genômicas de estirpes isoladas a partir dos nódulos de *Mimosa* spp.

TABELA 6 – Correspondência entre as sequências de *16SrRNA* amplificadas por meio de PCR convencional e as sequencias extraídas dos genomas sequenciados das estirpes isolados de *Mimosa* spp.

TABELA 7 - Valores de ANI para estirpes isoladas de nódulo de *Mimosa* spp. em comparação com genomas referência de *Paraburkholderia* spp.

TABELA 8 – Valores de ANI e GGDC para a comparação entre os genomas sequenciados das estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp.

TABELA 9 – Perfil lipídico de estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. no Paraná e estirpes referência de *Paraburkholderia guartelaensis*.

TABELA 10 – Ensaios de nodulação em *Mimosa pudica* para estirpes isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Lista de estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. no Paraná e Santa Catarina.

ANEXO 2 – Análises descritivas dos genes sequenciados a partir de estirpes selecionados isoladas de nódulos de *Mimosa* spp.

ANEXO 3 – Alinhamento entre o gene *16S rRNA* amplificado por meio de PCR convencional, e o gene *16S rRNA* extraído do genoma sequenciado de estirpes isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

ANEXO 4 – Genomas de estirpes referência utilizadas para análises genômicas comparativas com estirpes isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

ANEXO 5 – Crescimento em diferentes fontes de carbono de estirpes selecionadas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

ANEXO 6 - Genes responsáveis pela motilidade flagelar identificados nos genomas de *Paraburkholderia* spA, *P.* spD e *P.* spC.

ANEXO 7 – Comparações fenotípicas entre *Paraburkholderia* spA e estirpes tipo próximas do gênero *Paraburkholderia*.

ANEXO 8 – Comparações fenotípicas entre *Paraburkholderia* spD e estirpes tipo próximas do gênero *Paraburkholderia*.

ANEXO 9 – Comparações fenotípicas entre *Paraburkholderia* spC e estirpes tipo próximas do gênero *Paraburkholderia*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANI Identidade nucleotídica média
- ATP Adenosina trifosfato
- cm Centímetros
- DDH Hibridização DNA-DNA
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- dNTP Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- D.O. Densidade óptica
- DP Desvio Padrão
- ETDA Ácido etilenodiamino tetra-acético
- g Grama
- GGDC Calculador de distância genômica
- HCCA Ácido α-cyano-4-hydroxycinamido
- L Litro
- M Molar
- m Metros
- mg Miligrama
- mM Milimolar
- mmol Milimolar
- mL Mililitro
- m/z Razão entre massa/carga
- NCBI Centro Nacional de Informação Biotecnológica
- NFB Fixação Biológica do Nitrogênio
- NFs Fatores Nod
- NGS Sequenciamento de nova geração

- NN Número de nódulos
- pb Pares de base
- PCR Reação de polimerase em cadeia
- PN Peso dos nódulos
- Ref Referência
- rmp Rotações por minuto
- RNA Ácido ribonucleico
- SDS Dodecil-sulfato de sódio
- sp. espécie(s)
- U Unidade
- UFC Unidades formadoras de colônia
- UVP Luz ultravioleta
- v/v Porcentagem volume/volume
- µg Micrograma
- µL Microlitro

Sumário

Sumá	ário	. 14
1	INTRODUÇÃO	. 16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	. 19
2.1	NITROGÊNIO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	. 19
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	. 19
2.3	ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS	. 20
2.4	NÓDULOS	. 22
2.5	ORGANISMOS NODULANTES	. 24
2.6 GÊNE	BETAPROTEOBACTÉRIAS, O GÊNERO BURKHOLDERIA E A CRIAÇÃO ERO PARABURKHOLDERIA	DO . 26
2.7	GÊNERO MIMOSA (MIMOSOIDEAE, FABACEA)	. 27
2.8	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE PROCARIOTOS E RIZOBACTÉRIAS	. 29
3	OBJETIVOS	. 31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	. 32
4.1	CRESCIMENTO E ESTOQUE DE CULTURAS	. 33
4.2	ANÁLISES GENÔMICAS	. 33
4.2.1	Extração de DNA genômico	. 33
4.2.2	Análises taxonômicas e filogenéticas	. 34
4.2.3	Amplificação de marcadores genômicos (16S rRNA e recA)	. 34
4.2.4	Amplificação de genes da FBN e de nodulação (<i>nifH</i> e <i>nodC</i>)	. 35
4.2.5	Eletroforese de DNA em gel de agarose	. 35
4.2.6	Purificação e precipitação de DNA	. 36
4.2.7	Montagem e análise de sequências genômicas	. 36
4.3	ENSAIOS FENOTÍPICOS	. 37
4.3.1	Ensaios de temperatura ótima	. 37
4.3.2	Ensaios de salinidade ótima	. 37
4.3.3	Ensaios de pH ótimo	. 38
4.3.4	Ensaios de crescimento em diferentes fontes de carbono	. 38
4.3.5	Ensaios de resistência a antibióticos	. 38
4.3.6	Caracterização de Ácidos Graxos	. 39
4.3.7	Ensaios de Motilidade	. 39
4.4	ENSAIOS DE INTERAÇÕES PLANTA-BACTÉRIA	. 39
4.4.1	Ensaios de Nodulação	. 40
4.4.2	Quebra de dormência de sementes de <i>M. pudica</i>	. 40

4.4.3	Inoculação de estirpes de interesse	41
4.4.4	Coleta e isolamento das estirpes dos nódulos de <i>M. pudica</i>	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	42
5.1.1	Filogenia dos genes <i>16S rRNA</i> e <i>recA</i>	42
5.1.2	Filogenia de genes da FBN e de nodulação, <i>nifH</i> e <i>nodC</i>	48
5.2	CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS	53
5.3	ENSAIOS FENOTÍPICOS	58
5.3.1	Ensaios de crescimento em temperatura ótima	59
5.3.2	Ensaios de crescimento em salinidade ótima	60
5.3.3	Ensaios de crescimento em pH ótimo	62
5.3.4	Ensaios de crescimento em diferentes fontes de carbono	63
5.3.5	Ensaios de resistência à antibióticos	65
5.3.6	Caracterização de Ácidos Graxos	66
5.3.7	Ensaios de Motilidade	67
5.4	ENSAIOS DE INTERAÇÕES PLANTA-BACTÉRIA	69
5.4.1	Ensaios de nodulação	69
5.5 Parab	DESCRIÇÃO DAS NOVAS ESPÉCIES PROPOSTAS PARA O GÊNI burkholderia	ERO 71
5.5.1	Descrição de Paraburkholderia spA. nov	71
5.5.2	Descrição de <i>Paraburkholderia</i> spD. nov	72
5.5.3	Descrição de Paraburkholderia spC. nov	73
6	CONCLUSÃO	74
7	BIBLIOGRAFIA	75
8	ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

As interações entre leguminosas e bactérias como simbiontes são responsáveis pela dispersão destes dois grupos ao redor do mundo, ao mesmo tempo que moldam a agricultura e as atividades econômicas derivadas da mesma. A maior parte do nitrogênio assimilado no ecossistema é decorrente das interações planta-bactéria, a qual ocorre na rizosfera das leguminosas, dando origem à uma estrutura nas raízes denominada nódulo (REN et al., 2019). Bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas, comumente majoritariamente chamadas de rizóbios, estão distribuídas nos grupos Alfaproteobacteria e Betaproteobacteria, conhecidos como alfa-rizóbios e beta-rizóbios. A maioria dos rizóbios se encontra no primeiro grupo (16 gêneros), enguanto os betarizóbios estão, atualmente, restritos a três principais gêneros, Paraburkholderia, Cupriavidus e Trinickia (VELAZQUEZ et al., 2017), que incluem 91, 19 e 7 espécies descritas (válidas), respectivamente (LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, acesso em Fevereiro de 2022; PARTE et al., 2020 e 2014).

Se comparados às Alfaproteobacteria, betarizóbios apresentam ocorrência mais limitada, sendo majoritariamente encontrados na América Central e América do Sul, com o Brasil sendo um centro de diversidade par as interações entre leguminosas e estas bactérias (MYERS et al., 2000). Ainda que as leguminosas se encontrem bem distribuídas ao redor do mundo, esta família também tem como centro de dispersão o Brasil, com muitas espécies endêmicas sendo hospedeiras de uma grande variedade de rizóbios nodulantes, especialmente *Paraburkholderia* e *Cupriavidus sp.*, comumente associados com leguminosas do gênero *Mimosa* (MOULIN at al., 2015).

Mimosa é o maior gênero da subfamília *Mimosoideae* (Fabacea), com aproximadamente 60% de suas espécies endêmicas ou nativas do Brasil (350 sp.), crescendo em diversos solos e climas, particularmente em altitudes elevadas, nos biomas do Cerrado e Caatinga (DALL'AGNOL et al., 2017). Embora esteja bem estabelecido que os dois grupos, Alfa e Betaproteobacteria, são capazes de nodular *Mimosa* spp., o último parece ser mais presente nos nódulos destas leguminosas, trazendo a possibilidade de uma possível preferência das plantas pelos gêneros *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (ELLIOT et al., 2009).

Burkholderia sp. foi primeiramente isolada em cebolas como uma bactéria patogênica (KAURL et al., 2017), e até recentemente, apresentava mais de 70 espécies, ocupando diversos nichos, podendo ser encontradas no solo, vegetais, animais e rizosfera (BOURNAUD et al., 2013). Nos últimos anos, porém, o gênero tem sofrido

reclassificações taxonômicas, sendo proposto o gênero *Paraburkholderia*, separado de *Burkholderia* sp. por meio de sequências altamente conservadas de indels. Atualmente, no novo grupo, agora se encontram bactérias não patogênicas, incluindo rizóbios nodulantes, enquanto bactérias patogênicas vegetais e animais se mantiveram no gênero *Burkholderia* (SAWANA et al., 2014). Nos dias atuais, existem mais de 16 espécies de *Paraburkholderia* com estirpes fixadoras de nitrogênio, sendo a maior parte delas conhecidas por sua capacidade de interagir de forma simbiótica com leguminosas, em especial *Mimosa* spp. (VELAZQUEZ et al., 2017) e, a cada ano, novas espécies são descritas e caracterizadas.

Além disso, o estudo da diversidade de rizobactérias tem grande importância como recurso biológico na descoberta de bactérias capazes de promover o crescimento vegetal e aumentar a produtividade de culturas com valor econômico. Apenas um terço dos legumes conhecidos têm seus simbiontes identificados, em especial, rizóbios tropicais são pobremente descritos se levados em consideração os estudos mais recentes ao redor do mundo (BERRADA e FIKRI-BENBRAHIM, 2014). Sendo assim, mais estudos são necessários sobre estes microrganismos e suas interações, para que a taxonomia dos rizóbios seja melhor entendida.

Assim, a região sul brasileira apresenta uma grande diversidade de leguminosas do gênero *Mimosa*, com algumas espécies endêmicas e em risco de extinção (SIMON et al., 2011). O isolamento e as análises de bactérias nodulantes do gênero *Mimosa* nos estados do Paraná e Santa Catarina mostraram uma grande diversidade de Alfa e Betaproteobactérias, capazes de induzir a formação de nódulos, assim como bactérias potencialmente oportunistas (SILVA, 2018). De um total de 26 plantas amostradas do gênero *Mimosa*, 541 estirpes foram obtidas, representando 22 gêneros e 50 espécies, como *Cupriavidus necator, Paraburkholderia mimosarum* e *Paraburkholderia caribensis*.

Algumas estirpes, porém, não puderam ser identificadas a nível de espécie, e sequenciamentos genômicos indicaram potenciais novas espécies dos gêneros *Paraburkholderia, Herbaspirillum, Rhizobium* e *Cupriavidus* (SILVA, 2018). Moreira (2018) também isolou rizóbios de *Mimosa* spp. coletadas nos mesmos estados sul brasileiros, e através do sequenciamento de marcadores moleculares, foram selecionadas potenciais novas estirpes de *Paraburkholderia* spp. para análises genômicas, filogenéticas e fisiológicas.

O propósito desta dissertação foi o de dar continuidade ao projeto inicial de Silva (2018) e Moreira (2018), confirmando e descrevendo estas potenciais novas espécies de rizóbios, por meio de taxonomia polifásica aliadas a análises genômicas e

bioinformáticas. Os resultados sugerem três novas espécies de rizóbios do gênero *Paraburkholderia*, agrupados em três grandes e distintos grupos, próximos de espécies já bem caracterizadas e descritas no sul do Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NITROGÊNIO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

A atmosfera terrestre é composta de aproximadamente 70% de nitrogênio, de forma que esta molécula se encontra na sua forma gasosa de dinitrogênio atmosférico (N₂). Se visto seu papel biológico, o nitrogênio exerce um papel fundamental para os organismos, de forma que participa de inúmeras vias metabólicas e é componente da estrutura de moléculas imprescindíveis aos sistemas biológicos, como DNA, RNA e proteínas (MYROLD, 2021). A capacidade de assimilação de sua forma atmosférica, porém, não é acessível a grande maioria dos organismos vivos, sendo necessários processos de modificação desta molécula para que seja incorporada nos ecossistemas (GROFFMAN et al., 2021).

Uma das portas de entrada do nitrogênio se dá por meio da sua assimilação pelos vegetais, e posteriormente pelos próximos níveis tróficos. Assim, a disponibilidade de nitrogênio para utilização entre as plantas é realizada pela redução deste em outros compostos nitrogenados (CARVALHO, 2012), disponíveis no solo na forma de nitratos (NO₃) e amônias (NH₃). Quando incorporado, o nitrogênio atua ativamente na constituição de vários componentes vegetais, e seu balanço afeta a formação de raízes, fotossíntese e taxa de crescimento foliar (KUSS, 2006). A metabolização desta molécula ocorre inicialmente das raízes, sendo que após isso, boa parte da sua dispersão para as outras regiões vegetais já ocorre com o nitrogênio incorporado aos aminoácidos e outras moléculas orgânicas (GALLO, 2013).

Além da redução de N₂ por meios biológicos, mais conhecida como o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), outras duas principais formas são conhecidas, sendo uma delas por meio de processos geoquímicos, como raios, e industrialmente, por meio do processo de Haber-Bosch (HOFFMAN et al., 2014). O principal composto gerado por este último (NH₃), é a base dos fertilizantes nitrogenados, utilizados para aumentar a produtividade de cultivares comerciais (FRAZÃO et al., 2014) em grande parte ligados a agricultura e consequentemente a indústria de alimentos, farmacêutica e a cosméticos (ERISMAN, 2011).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) está intimamente ligada a microrganismos capazes de reduzir N₂ atmosférico em NH₃, e é ecologicamente importante, pois atua como principal entrada de nitrogênio fixado em muitos habitats

terrestres e aquáticos (TAYLOR et al., 2020). Esta via está apenas presente em microrganismos procariontes, sendo que estes são denominados diazotróficos, e estão espalhados por mais de 100 gêneros, entre Eubacteria e Archaea, não ocorrendo em eucariontes (MUS et al., 2016). Para tal, é necessário que haja a presença de um complexo nitrogenase, que catalisa a redução do dinitrogênio atmosférico em amônia (ROY et al., 2020), que posteriormente é convertida em amidas e/ou ureídos, sendo estes últimos então incorporados às plantas.

Os genes necessários para que ocorra a reação catalisada pela enzima nitrogenase, *nifD*, *K* e *H*, podendo ser encontrados agrupados em operons (*nifHDK*) em algumas espécies (*Rhizobium leguminosarum*), ou separadamente em outras (*Rhizobium japonicum*). O gene *nifH* codifica para polipeptídios que farão parte da dinitrogenase-redutase, enquanto os genes *nifK* e *nifD* codificam para as subunidades da proteína MoFe (BASU e KUMAR, 2020).

De forma geral, o complexo nitrogenase atua por meio da redução do dinitrogênio gasoso, acoplando a hidrólise de ATP à transferência de elétrons. A ligação e redução completa de N₂ requer oito elétrons, e dessa forma oito ciclos são realizados, com a utilização de 16 ATP, gerando duas moléculas de amônia. Desta forma, além desta reação se mostrar energeticamente dispendiosa (HOFFMAN et al., 2014), também é sensível ao oxigênio (O₂) no meio, em virtude da atividade redox de uma de suas subunidades, de forma que a presença de O₂ pode inativar a enzima, causando sua repressão de acordo com a pressão parcial do gás (HASKETT et al., 2021).

Assim, há a necessidade de um ambiente anaeróbico para que a FBN ocorra, de forma que a ausência de oxigênio deve ser equilibrada com a sua disponibilidade para que haja ATP para a reação. Neste norte, os diazotróficos desenvolveram inúmeras estratégias para limitar o acesso deste gás à nitrogenase, desde a evolução de estruturas como os nódulos em leguminosas, quando simbiontes, até uma delicada sinalização intracelular para regular a entrada e disponibilidade de oxigênio na célula (LERY et al., 2010).

2.3 ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

Os microrganismos que se utilizam do N₂ como substrato para o complexo nitrogenase são conhecidos como fixadores de nitrogênio ou diazotróficos (REIS et al. 2006). A seleção para um genoma com genes que codificassem o complexo nitrogenase, e consequentemente a fixação biológica do nitrogênio, ocorreu a partir de uma forte seleção para enzimas com papel de desintoxicação celular, em um ambiente

atmosférico ancestral com a necessidade de carácter redutor (MUS et al., 2019). Os primeiros diazotróficos foram isoladas por volta de 1900, e análises moleculares mostram que os genes necessários para a FBN (genes *nif*) em vários grupos mantém sua estrutura conservada, e indicam uma história evolutiva de aproximadamente 2 bilhões de anos (HOFFMAN et al., 2014).

Assim, fixadores de nitrogênio são encontrados em vários filos, e boa parte dos representantes destes grupos são conhecidos por estarem presentes nos solos, muitos mantendo relações simbióticas com plantas, principalmente com leguminosas (MUS et al., 2016). Algumas bactérias gram-negativas evoluíram a capacidade de interação com estes vegetais, sendo que esta ocorre na parte radicular da planta hospedeira, levando à formação de um órgão específico, o nódulo, no qual os diazotróficos se diferenciam em bacterióides (OLDROYD e LONG, 2003). Com isso, a fixação de nitrogênio ocorre e o nitrogênio reduzido é distribuído entre planta e microrganismo, sendo incorporado nos tecidos vegetais e, em troca, a planta fornece moléculas essenciais aos procariontes, principalmente fontes de carbono (NELSON e SADOWSKY, 2015).

A interação entre planta e bactéria tem grande efeito na saúde e rendimento de culturas e do solo, sendo que os diazotróficos auxiliam seus hospedeiros à uma melhor resposta ao stress ambiental, se comparadas a plantas não simbiontes, tanto por meio do aumento da disponibilidade de nutrientes, quanto pela maior estruturação do solo e indução de mecanismos de defesa vegetal (FIELDS, et al., 2021). Assim, quando estes diazotróficos estabelecem relações simbióticas com seus hospedeiros e levam à formação de nódulos nas raízes, são chamados de rizóbios (LAJUDIE et al., 2019).

Atualmente, rizóbios estão inclusos dentro da ordem Rhizobiales e distribuídos em três classes, alfa, beta e gama proteobactérias, contendo sete famílias (Figura 1). Dentro destas, mais de 230 espécies de bactérias ondulantes estão distribuídas por 18 gêneros, de forma que o número sobe a cada ano, principalmente com o advento da biologia molecular e o sequenciamento de genomas inteiros (SHAMSELDIN, A. et al., 2016).

FIGURA 1 – Diagrama da distribuição de rizóbios dentro das classes alfa e betaproteobactéria.



FONTE: SHAMSELDIN, A. et al., 2016.

2.4 NÓDULOS

Após algumas horas do primeiro contato entre bactéria e as raízes de seu hospedeiro se inicia a formação dos nódulos, primeiramente em regiões de alongamento e na zona de formação dos pelos radiculares (FAGAN et al., 2007). A localização do nódulo propicia um ambiente favorável ao desenvolvimento bacteriano e à redução de dinitrogênio pelo complexo nitrogenase, através do isolamento das bactérias aos fatores externos e da limitação a entrada de O₂, respectivamente (MUS et al., 2016).

A sinalização para a formação do nódulo é complexa e não totalmente resolvida, e se inicia pela excreção de flavonoides na rizosfera pelas células radiculares da planta (FIGURA 1). Estas moléculas ativam a expressão de determinados genes nos rizóbios, conhecidos como genes *nod*, prioritariamente *nodD* (HASSAN e MATHESIUS, 2015), tendo como papel regular a codificação de ligases de DNA, que quando expressas ativam os genes *nodABC* (ROCHE et al., 1996). *nodA* e *nodB* têm influência no crescimento vegetal através da estimulação de processos mitóticos, além de codificar para estruturas dos fatores Nod (NFs), juntamente com *nodC*, que atua na montagem desses fatores e é determinante na especificidade de hospedeiros (NELSON e SADOWSKY, 2015).

FIGURA 2 – Sinalização entre hospedeiro e microrganismos simbiontes, ilustrando o papel dos flavonoides da ativação de genes *Nod* de rizóbios na colonização das raízes da leguminosa.



FONTE: ABDEL-LATEIF et al., 2012.

Análises filogenéticas demonstram uma origem única para os genes *nodABC*, e sua estrutura no genoma se mantém conservada na maioria dos rizóbios, suportando a origem monofilética e também uma possível transferência horizontal gênica para outros diazotróficos (ANDREWS e ANDREWS, 2017). Há uma diversidade maior, porém, dentro de *nodD*, que atua diretamente na especificidade rizóbios-hospedeiro, já que é ativado por sinais vegetais de diferente composição e concentração, e que variam de acordo com a planta (MOSCATIELLO et al., 2010). Estes sinais que ativam *nodD* são liberados nos exsudatos vegetais, compostos orgânicos de baixo peso molecular (açúcares, ácidos graxos, esteróis, fatores de crescimento e vitaminas), específicos a cada espécie vegetal, fase de crescimento e condições ambientais (MUS et al., 2016).

Dessa forma, os exsudatos influenciam na estrutura das comunidades microbianas da rizosfera, agindo como meio de seleção para que a planta recrute populações específicas de microrganismos (SILER e FRIESEN, 2017). Esta interface também é ajustada por meio dos fatores Nod secretados pelos rizóbios, que atuam na comunicação celular entre planta e bactéria (MUS et al., 2016). Os NFs são lipo-quito oligossacarídeos reconhecidos pelos legumes através de receptores específicos (NFRs), e atuam tanto em células epidérmicas quanto em células corticais das raízes, estimulando o processo mitótico na região cortical e dando início ao primórdio nodular (MOULIN et al., 2015).

Uma variação nos genes que codificam para os NFs pode gerar maior diversidade na composição da molécula, o que auxilia na manutenção de uma população de bactérias eficientes na infecção dos tecidos vegetais, através da seleção de NFs com maior sucesso na sinalização entre planta/bactéria (REMIGI et al., 2016). Por meio destes mecanismos, as leguminosas proporcionam um ambiente de seleção de populações bacterianas mais hábeis à infecção e nodulação de suas raízes, com maior eficiência em disponibilizar compostos nitrogenados, e acabam estimulando também, a própria competição entre rizóbios, estabelecendo taxa mais predominantes nestas interações (SILER e FRIESEN, 2017).

2.5 ORGANISMOS NODULANTES

Genes simbióticos se estabilizaram em vários gêneros de bactérias, e esta diversidade tem sido a chave para o sucesso evolutivo da simbiose entre rizóbios e leguminosas, presente em aproximadamente 90% das espécies pertencentes aos gêneros *Mimosoideae* e *Papillionoideae* (Fabaceae) (SPRENT et al., 2016). Diazotróficos nodulantes estão distribuídos em mais de 200 espécies, em dois principais grupos: Alfaproteobactérias e Betaproteobactérias, pertencentes às Proteobactérias (Figura 2) (REMIGI et al., 2016). A grande maioria dos rizóbios se enquadra no grupo das Alfaproteobactérias, ou α-rizóbios, com nove gêneros capazes de fixar nitrogênio (RAHIMLOU et al., 2021). Os gêneros mais comuns encontrados são *Azorhizobium, Allorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium, Devosia, Methylobacterium, Ochrobactrum* e *Phyllobacterium* (BOURNAUD et al., 2013).

Até 2001, Alfaproteobactérias eram as únicas classificadas como rizóbios, sendo isoladas pela primeira vez em 1890, estabelecendo o gênero *Rhizobium*. Já nos anos 2000, utilizando ferramentas de relógio molecular, foi determinada a separação dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em aproximadamente 800-300 milhões de anos (WALKER et al., 2015).

FIGURA 3 - Distribuição dos principais gêneros de rizóbios dentro da filogenia das Proteobactérias.



FONTE: RAHIMLOU et al, 2021.

Em 2001, Moulin et al. (2001) isolaram representantes de Betaproteobactérias nodulando leguminosas, definindo dois principais gêneros, *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (CHEN et al., 2005). A partir disto, inúmeras revisões taxonômicas acerca do gênero *Burkholderia* vêm sendo feitas, e atualmente as Betaproteobactérias apresentam três principais gêneros com espécies de rizóbios (*Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Trinickia*) (LAJUDIE et al., 2019).

Análises filogenéticas indicam que *Paraburkholderia* e *Rhizobium* adquiriram os genes necessários para nodulação próximo ao surgimento das leguminosas no planeta (WALKER et al., 2015), de forma que a interação simbiótica entre os dois provavelmente se deu em único evento (WERNER et al., 2014). Neste período, acredita-se que os grupos de Alfa e Betaproteobactérias já estivessem definidos, e os genes *nod* necessários à nodulação seriam adquiridos então, por transferência horizontal entre entres organismos. Atualmente, porém, contrário à crença de que a origem dos genes

simbióticos remetesse às alfaproteobactérias, estudos demonstram que este surgimento se deu em bactérias pertencentes aos Betarizóbios (AOKI et al., 2013).

2.6 BETAPROTEOBACTÉRIAS, O GÊNERO BURKHOLDERIA E A CRIAÇÃO DO GÊNERO PARABURKHOLDERIA

Burkholderia pertence à classe Betaproteobacteria (família sp. Burkholderiaceae). O gênero foi primeiramente descrito por Burkholder que descreveu bactérias patogênicas de cravo e cebola (KAUR et al., 2017). Em 1992, Yabuuchi et al. (1992), propuseram a reclassificação de diferentes organismos antes pertencentes ao gênero Pseudomonas, para Burkholderia sp., baseando-se em sequências de 16S rRNA, homologia genética e análises de citologia. Até 2014, o gênero apresentava mais de 70 espécies, ocupando diversos nichos ecológicos (BOURNAUD et al., 2013) e habitat cosmopolita, podendo ser encontradas nos solos, água doce/salgada, na rizosfera e em vários animais, e envolvido tanto em doenças humanas quanto em controle de patógenos vegetais, biorremediação, e promoção de crescimento vegetal (SANTOS et al., 2018).

Mais recentemente, o gênero tem sofrido mudanças, sendo proposta a criação de um novo gênero, *Paraburkholderia*. A separação do gênero foi sugerida por Sawana e colaboradores (2014), utilizando sequências conservadas de indels que caracterizaram as diferentes espécies de *Burkholderia* em espécies patogênicas animais, inseridas no complexo *Burkholderia cepacia*, juntamente com fitopatogênicos e espécies não patogênicas. Dessa forma, o primeiro grupo abrangeria espécies patogênicas vegetais, animais e humanas, sendo mantidas no gênero *Burkholderia*, e o segundo grupo, transferido para o gênero *Paraburkholderia*, incluindo espécies não patogênicas, entre elas nodulantes vegetais (Figura 3) (KAUR et al., 2017).

Algumas fitopatologias têm como agentes causadores espécies do gênero *Burkholderia* (complexo *B. cepacia*), como *Burkholderia andropogonis*, associada danificações foliares em *Ruscus sp.* (ALMEIDA et al., 2009), *Burkholderia gladioli pv. alliicola*, causadora de patologia em cebolas (BURKHOLDER, 1950), e Burkholderia glumae e Burkholderia plantari, importantes patógenos de cultivares de arroz. Ainda, algumas estirpes de *Burkholderia cepacia* são classificadas como oportunistas patógenos humanos, relacionadas à fibrose cística e imunodeficiências (MAHENTHIRALINGAM et al. 2003).



FIGURA 4 - Filogenia do gênero Burkholderia/Paraburkholderia.

FONTE: KAUR et al, 2017.

Paraburkholderia spp. abrange bactérias altamente diversas e adaptadas aos ecossistemas, capazes de ocupar vários nichos, em diversos solos (PRAMATA e ELSAS, 2017). Até 2017, 14 espécies do gênero *Paraburkholderia* foram descritas nodulando legumes. Estas espécies podem ser distinguidas através de seu espectro de hospedeiros e genes nodulantes, de forma que isolados provenientes de legumes africanos e australianos se distinguem de isolados de legumes sul-americanos (comumente do gênero *Mimosa*) (BOURNAUD et al., 2017).

2.7 GÊNERO MIMOSA (MIMOSOIDEAE, FABACEA)

A família Leguminosae (Fabaceae) é a terceira maior família botânica, com aproximadamente 19 mil espécies, monofilética, e compreendendo três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papillionoideae (WALKER et al., 2015). Os legumes apresentam grande importância econômica e ambiental, tanto por seu habitat cosmopolita quanto por sua associação simbiótica com vários microrganismos, sendo mais relevantes os fixadores de nitrogênio (WERNER et al., 2014). Ainda que cosmopolita, as leguminosas têm por um de seus centros de irradiação e diversificação o Brasil, que contém várias espécies endêmicas e que são capazes de nodular com uma grande variedade de proteobactérias (MOULIN et al., 2015).

O gênero *Mimosa* é o maior dentro da subfamília Mimosoideae, com quase 60% das espécies sendo nativas ou endêmicas do Brasil (350 sp.), com seu segundo maior centro de irradiação, o México (100 sp.) (DALL'AGNOL et al., 2017). O gênero se associa tanto com Alfaproteobactérias quanto com Betaproteobactérias, porém a maior parte das espécies no Brasil demonstram uma forte preferência por *Paraburkholderia sp.* Ainda, três espécies invasoras (*M. pudica, M. pigra* e *M. diplotricha*) nativas das Américas, tem se espalhado e se fixado em regiões tropicais e subtropicais do sudeste asiático, como Taiwan e outros locais da China, com utilização medicinal e comercial (LIU et al., 2012), além de regiões da Austrália (WALKER et al., 2015).

Embora *Mimosa* spp. também apresente centros de dispersão no Velho Mundo, como Madagascar e leste Africano (30 sp.) e Ásia (6 sp.), seu principal centro é o continente americano, com aproximadamente 500 spp. Estas são encontradas em uma variedade de habitats, crescendo em diferentes solos e climas, particularmente abundantes no Cerrado e Caatinga brasileiros, em locais elevados (>1000m) (BONTEMPS et al., 2016). Os principais microrganismos simbiontes encontrados em *Mimosa* spp. são do gênero *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*, sendo este segundo gênero o menos amostrado, com apenas duas espécies: *C. taiwanensis* e *C. necator* (BOURNAUD et al., 2013).

LIU e colaboradores (2011) isolaram betarizóbios de *Mimosa* spp. provenientes de regiões tropicais chinesas, nas quais o legume é considerado espécie invasora, e evidenciaram uma forte co-evolução entre os grupos e uma grande competitividade entres os gêneros de Betaproteobacteria, demonstrando que embora *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* coexistam no solo, apenas um dos gêneros é encontrado nos nódulos de *Mimosa* spp. Além de competição dentro dos betarizóbios, Elliott et al. (2009) evidenciaram uma competição entre as classes Alfa e Betaproteobacteria, demonstrando que a maioria das espécies de *Mimosa* têm preferência pelo segundo grupo, havendo diferença na variação de espécies colonizadoras.

Algumas espécies de *Mimosa* têm por preferência a colonização de apenas uma espécie de *Paraburkholderia*, enquanto em outras, são encontrados nódulos de mais de uma espécie do gênero, ou até de gêneros diferentes. Ainda, a estrutura das populações

de rizóbios em *Mimosa* spp. diferem significativamente entre solos, os quais características como pH, fertilidade e disponibilidade de nitrogênio afetam a simbiose (PIRES et al., 2018). Em geral, solos com pH mais alcalino tendem a favorecer colonização por Alfaproteobactérias ou pelo gênero *Cupriavidus*, enquanto solos com maior acidez propiciam um ambiente mais favorável à nodulação por espécies de *Paraburkholderia* (MISHRA et al., 2012).

Tal fato pode ter influenciado as pesquisas de Bontemps et al. (2016), que evidenciaram uma predominância de α-rizóbios es espécies endêmicas de *Mimosa* mexicanas, cujo solo se mostrou fértil e de pH alcalino, diferentemente do solo do centro brasileiro, mais ácido, no qual Reis et al. (2010) observaram predominância de *Paraburkholderia* sp. na maioria dos hospedeiros. Ainda, no Uruguai, em solos com alto nível de metais pesados, *Mimosa* spp. foi encontrada nodulando majoritariamente com o gênero *Cupriavidus* (Platero et al., 2016).

Outro fator a ser questionado é a coevolução entre estes taxa. No caso do gênero *Mimosa*, é possível que cada grupo de cada país ou continente tenha coevoluído com seus respectivos simbiontes por milhões de anos, aumentando a especificidade desta relação. Esta hipótese é particularmente relevante no caso de espécies endêmicas, cujo a restrição a áreas e condições ambientais únicas podem ter agido restringindo a capacidade de nodular com uma maior gama de simbiontes (PIRES et al., 2017).

Na região sul brasileira, a diversidade do gênero ainda é estudada e se torna difícil pela distribuição cosmopolita, e a presença de inúmeras espécies endêmicas e ainda não descritas. No Rio Grande do Sul e Santa Catarina, estudos iniciais estimaram aproximadamente 100 espécies, como *M. dolens* e *M. lanata* (SILVEIRA, 2015). Em geral, no Paraná, se tem descrito principalmente *Mimosa scabrella* fazendo parte da Floresta Ombrófila Mista Montana, também reconhecida como Floresta de Araucárias, pela grande predominância da espécie *Araucaria angustifólia* (ROJERDAN et al., 2002). Além de *M. scabrella*, pelo menos mais 14 espécies são descritas no estado, dentre elas *M. pudica, M. pigra, M. bimucronata* (FRANCO et al., 2019), *M. daleoides* e *M. flocculosa* (MACHADO, 2020).

2.8 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE PROCARIOTOS E RIZOBACTÉRIAS

Classicamente, a identificação de rizóbios se dá por meio da caracterização taxonômica de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas, principalmente por meio de amplificação e sequenciamento de genes universais, como o *16S rRNA*, que por muito tempo auxiliaram na resolução da taxonomia destes e outros procariotos. Consensualmente, valores estabelecidos por meio da comparação e alinhamento desde gene com bancos de dados confirma que identidades menores de 98.7% delimitam espécies diferentes (YARZA et al., 2014). Com os avanços no sequenciamento genômico e em análises filogenética, porém, a utilização deste gene como único marcador filogenético caiu em desuso, visto que diversos estudos apontam para sua baixa resolução nos mais vários níveis taxonômicos (VETROVSKI e BALDRIAN, 2013; PARKS et al., 2018; RAHIMLOU et al., 2021).

Desta forma, diversos estudos têm se utilizado de alinhamentos concatenados de sequências não apenas de genes ribossomais, como o *16S rRNA*, mas também de genes codificadores para proteínas, para alcançar maior resolução na construção das árvores filogenéticas (THIERGARD et al., 2014). Uma das proteínas mais utilizadas para a taxonomia de rizobactérias é a expressa pelo gene *housekeeping recA*, que atua tanto no reparo do DNA – associada a regulação do sistema SOS - quanto a recombinação, alinhamento e pareamento do mesmo, altamente conservada no genoma bacteriano e presente em diversos taxa (LUSETTI e COX, 2002; COX e MICHAEL, 2007).

Assim, a caracterização de novas espécies de rizóbios nas últimas décadas tem se valido da taxonomia polifásica, construída tanto por meio de ensaios bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, quanto pelo esclarecimento da posição filogenética das estirpes através da amplificação e sequenciamento de genes de cópia única, como os mencionados acima, e análises genômicas básicas, realizadas em bancada, como a hibridização DNA-DNA (DDH) (GRAHAM et al., 1991). Nos últimos anos, porém, os padrões mínimos para a identificação e caracterização destes novos rizóbios têm se alterado e incluído análises mais detalhadas, principalmente relacionadas aos dados genômicos e à bioinformática comparativa.

Os padrões mínimos a serem seguidos têm se baseado em informações geradas por meio de sequenciamento genômico total, que levam em conta a porcentagem de bases G + C dos genomas, tamanho em pares de base (pb), além da comprovação da capacidade da estirpe isolada em fixar nitrogênio e estimular a formação de nódulos em seu hospedeiro, por meio de ensaios de nodulação e amplificação de genes chave para estas vias metabólicas, como *nifH* e *nodC*, respectivamente (LAJUDIE et al., 2019). Ainda, análises comparativas entre os dados gerados por meio do sequenciamento genômico total dos potenciais novos isolados com banco de dados de espécies filogeneticamente próximas é altamente recomendado.

A identidade nucleotídica média (ANI), junto ao calculador de distâncias genômicas GGDC v2.1 (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013; AUCH et al., 2010a; AUCH et al., 2010b;RICHTER e ROSSELLÓ-MÓRA, 2009) tem eficientemente substituído as técnicas de hibridização DNA-DNA de bancada, e são amplamente alimentadas por bancos de dados como o GenBank do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (BENSON et al., 2013). Assim, a caracterização genômica reduziu a necessidade de rebuscadas análises fenotípicas, de forma que hoje, apenas alguns ensaios são recomendados para a publicação de novas espécies (LAJUDIE et al., 2019).

Análises como a utilização de fontes de carbono, condições ótimas de crescimento das estirpes e perfil lipídico geram informações discriminativas entre espécies e são úteis na descrição de isolados potencialmente novos. Aliar a clássica taxonomia polifásica às ferramentas bioinformáticas e aos dados fornecidos pelo sequenciamento de nova geração (NGS) têm sido a chave para resultados robustos na confirmação de novas espécies de rizobactérias.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é descrever a diversidade existente de rizobactérias nodulantes do gênero *Mimosa* no sul do Brasil, assim como caracterizar e descrever potenciais novas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, mais comumente denominadas rizóbios, nodulantes de legumes do gênero *Mimosa*, baseado em taxonomia polifásica, a fim de ampliar a diversidade existente de rizóbios, por meio de ensaios bioquímicos, análises genômicas e em ensaios de nodulação e promoção do crescimento vegetal.

Como objetivos específicos, pode se citar:

- a) Analisar genomicamente as estirpes isoladas, por meio de sequenciamento de DNA de genes marcadores com importância taxonômica, de fixação de nitrogênio e de nodulação, e por meio de sequenciamento genômico total;
- b) Realizar ensaios de interação planta-bactéria para confirmar a capacidade de nodulação das estirpes e para analisar a capacidade de promoção de crescimento vegetal das estirpes;
- c) Caracterizar as estirpes microbiológica, fisiológica e bioquimicamente, por meio de ensaios para caracterização morfológica, determinação de perfil lipídico e de crescimento em diferentes condições de temperatura, fonte de carbono, pH e salinidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CRESCIMENTO E ESTOQUE DE CULTURAS

Estirpes previamente isoladas foram crescidas a 28°C por 2 a 4 dias no meio NFb sólido, tendo malato como fonte de carbono (KLASSEN et al., 1997) e no meio YMA (Yeast-Mannitol-Agar) (VICENT, 1970). As culturas, após crescidas, foram mantidas em meio YMA a 4°C e, para estoques de longa data, foram preservadas em meio YM com glicerol 30% (v/v) a -20°C.

As estirpes referência utilizadas nos ensaios foram cedidas pela Embrapa-Soja (*P. guartelaensis* CNPSo 3008^T; *P. atlantica* CNPSo 3155^T; *P. franconis* CNPSo 3157^T) e pela Embrapa-Agrobiologia (*P. phymatum* STM815^T).

4.2 ANÁLISES GENÔMICAS

4.2.1 Extração de DNA genômico

Para análises de biologia molecular e análises filogenéticas, o DNA genomico total dos Isolados foi extraído seguindo o protocolo adaptado de Stirling (2003). As estirpes de interesse foram inoculadas em 5 mL de meio YMA e incubadas a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem densidade óptica (D.O.₅₉₅) de 1. Após, 1,5 mL da cultura foi transferido para um tubo de rosca de 2 mL e centrifugado por 60 segundos a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de Tampão de Extração A (Triton X v/v 2%; SDS v/v 1%; NaCl v/v 100mM; Tris-HCl pH8 v/v 10mM; EDTA pH8 v/v 1mM; H₂O) e homogeneizado com auxílio de vórtex.

Posteriormente foram adicionadas pérolas de vidro estéreis (aproximadamente 200 mg), 100 mL de fenol pH8 e 100 mL de clorofórmio álcool isoamílico (v/v 1:1) e a solução foi homogeneizada em vórtex por 3 minutos. 200 μ L de tampão TE (Tris-HCl pH8 v/v 10mM; EDTA pH8 v/v 1mM; H₂O), homogeneizado 10 vezes e centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um tubo novo de 1,5 mL e 1 mL de etanol 100% (v/v) foi adicionado, sendo o tubo homogeneizado 5 vezes e centrifugado por 4 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado ressuspendido em 50 μ L de tampão TE e 1 μ L de RNAse, e então incubado por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, 350 μ L de H₂O ultrapura estéril e 5,3 μ L de Acetato de Amônia (7,5 mol/L) foram adicionados e o tubo foi homogeneizado por inversão cinco vezes, e 1 mL de etanol 100% resfriado a 4 °C foi adicionado à solução e novamente homogeneizado.

A solução foi então centrifugada por 4 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado em estufa por 1 hora a 37 °C ou overnight na bancada. O material genético extraído foi então ressuspendido em 40 µL de tampão TE e preservado a -20 °C.

4.2.2 Análises taxonômicas e filogenéticas

Para a caracterização taxonômica, sequências do gene 16S rRNA foram recuperadas do banco de dados GenBank do NCBI (BENSON et al., 2013), baseandose nas estirpes tipo validadas e descritas na "*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*" (LPSN; PARTE et al., 2020). Sequências previamente adquiridas dos isolados provenientes de nódulos de *Mimosa* spp. entre 2016 e 2018 nos estados do Paraná e Santa Catarina no sul do Brasil, foram utilizadas junto às sequências obtidas do NCBI. Inicialmente, o *software* CD-HIT (FU et al., 2012) foi utilizado para agrupar todas as sequências, utilizando configurações pré-definidas (e limite de identidade por sequência como indicado no texto).

O alinhamento e as análises filogenéticas foram realizados utilizando o *software* MEGA 7 (Kumar et al., 2016) e BioEdit (HALL, 1999). Primeiramente, as sequencies foram alinhadas por meio da ferramenta *Clustal W* (LARKIN et al., 2007), e o alinhamento *16S rRNA-recA* foi concatenado, seguido pela construção de uma árvore filogenética com o algoritmo *Neighbor-Join* (NJ) (SAITOU e NEI, 1987), sendo as distâncias filogenéticas computadas utilizando o método *Jukes-Cantor* (JUKES and CANTOR, 1969). O suporte estatístico para a árvore foi avaliado por meio de análises de *bootstrap* com 1000 replicatas (FELSENSTEIN, 1985).

4.2.3 Amplificação de marcadores genômicos (16S rRNA e recA)

Por meio das análises de CD-HIT, estirpes foram selecionados para a amplificação do gene *housekeeping recA* que, juntamente com sequencies de *16S rRNA*, foi utilizado para inferir a posição filogenética das estirpes. Os *primers* utilizados para a amplificação do gene *16S rRNA* por meio de PCR convencional foram o *primer* 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991), enquanto para o gene *recA*, *primers recABurkF* (5' GATCGARAAGCAGTTCGGCAA-3') e *recABurkR* (5'TTGTCCTTGCCCTGRCCGAT-3') foram utilizados (BONTEMPS et al., 2010).

A reação de amplificação por meio de PCR incluiu 4 μ L 10X solução tampão, 1,2 μ L MgCl₂, 0,8 μ L dNTPs (5 mmol / L), 1 μ L de cada *primers* (*foward* e *reverse*), 0,1 μ L

da enzima GoTaq DNA polymerase (GoTaq[®] DNA Polymerase, Promega Corporation[™]) e 11,9 µL de água ultrapura, para 20 µL de volume final. A ciclagem utilizada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies) foi uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C; 25 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95 °C; anelamento por 30 segundos a 58 °C; extensão por 40 segundos a 72 °C; e uma extensão final por 7 minutos a 72 °C.

4.2.4 Amplificação de genes da FBN e de nodulação (*nifH* e *nodC*)

A amplificação dos genes *nifH* e *nodC* foram realizadas por meio PCR convencional, que incluiu 4 μ L 10X solução tampão, 1,2 μ L MgCl₂, 0,8 μ L dNTPs (5 mmol / L), 1 μ L de cada *primers* (*foward* e *reverse*), 0,1 μ L da enzima GoTaq DNA polymerase (GoTaq[®] DNA Polymerase, Promega CorporationTM) e 11,9 μ L de água ultrapura, para 20 μ L de volume final. O ciclo de temperaturas utilizado no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies) para os genes foi uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C; 25 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95 °C; anelamento por 30 segundos a 55 °C (*nifH*) e 60 °C (*nodC*); extensão por 40 segundos a 72 °C; e uma extensão final por 7 minutos a 72 °C.

Para a amplificação do gene *nifH* foram utilizados os *primers* NifH-F1 (5' CGCIWTYTACGGIAARGGIGG-3') e NiFH-R1 (5' GGIKCRTAYTSGATIACIGTCAT-3') (CHEN et al., 2003), enquanto para a amplificação do gene *nodC* os *primers* utilizados foram NodCF1 (5' ACTSATACTYAACGTMGAYTC-3') e NodCR1 (5' GMRAAYCCRAGAAATCGAAG-3') (BONTEMPS et al., 2010). Os passos seguintes para a confirmação da amplificação, sequenciamento e análise dos genes se deram da mesma forma que para os genes *16S rRNA* e *recA*, indicados na sessão 4.2.4 – 6.

4.2.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Após amplificação dos genes de interesse por PCR, amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em sistema HOEFFER em gel de agarose 0,8%, utilizando tampão TAE 1X (base Tris 40 mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH8), com corrente elétrica de 70 volts por 50 minutos, diluindo 2 μ L de amostra em 2 μ L de corante Fsuds (azul de bromofenol 0,8%, phycol 10%, xileno de cianol 0,4%, SDS 1%, ETDA 1,8 mmol/L, pH8) e aplicando no gel. Posteriormente, o gel de agarose foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) por 15 minutos e observado luz ultravioleta 320 nm em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA-USA), para reconhecimento da amplificação dos genes para cada amostra.

4.2.6 Purificação e precipitação de DNA

O processo de purificação do produto amplificado foi feito utilizando uma reação enzimática simultânea, com 0,66 μ L de Exonuclease I (EXO I – 5,2 U/ μ L - Ferments), 0,66 μ L de FastAP (0,77 U/ μ L - Ferments) e 0,68 μ L de água ultrapura, para 20 μ L de material amplificado. A reação foi submetida a incubação por 60 minutos a 37 °C e subsequente inativação das enzimas por 15 minutos a 85° C.

Posteriormente, 4 µL do amplificado previamente purificado foi utilizado, junto a 1,2 µL de primer, 2 µL de tampão Save Money (10% (v/v) com MgCl₂ 250 mmol/L, TrisHCl 20% (v/v) (pH 9,0)), 0,8 µL de BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit e 2 µL de água ultrapura estéril, para completar 10 µL de reação para a segunda etapa de purificação de DNA. A ciclagem utilizada no termociclador foi um primeiro ciclo de 1 minuto a 95° C; 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 58 °C, 3 minutos a 60 °C e um ciclo final de 5 minutos a 60 °C. Neste processo, os mesmos *primers* utilizados para a amplificação dos genes *16S rRNA* e *recA* foram utilizados para suas respectivas reações de purificação.

Após, foi realizado o processo de precipitação do DNA purificado, por meio da adição de 2 μ L de acetato de amônio (7,5 mol/L), 10 μ L de água ultrapura estéril e 66 μ L de etanol absoluto, junto a 10 μ L de DNA purificado. A solução foi solubilizada e centrifugada por 30 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e 100 μ L de etanol 70% foram adicionados, e a solução foi novamente centrifugada por 15 minutos a 14000 rpm, sendo posteriormente o sobrenadante descartado. O precitado foi deixado para secagem a temperatura ambiente durante a noite e ressuspendido em 30 μ L de tampão TE. A leitura das sequências foi obtida por meio de sequenciador automático *AppliedBiosystems*®3500 e 3500xL*GeneticAnalyzers*.

4.2.7 Montagem e análise de sequências genômicas

O DNA total de seis estirpes selecionadas foi extraído, como descrito anteriormente, e submetido a sequenciamento de DNA de próxima geração (NGS, do inglês, *next generation sequencing*) utilizando tecnologia Illumina. O sequenciamento foi realizado por *MicrobesNG (University of Birmingham, UK*), no qual as sequências iniciais foram filtradas por sua qualidade utilizando a ferramenta "trimmomatic"
(BOLGER et al., 2014). A montagem foi realizada utilizando a ferramenta CLC *Genomic Workbench* v7, e *SPAdes* (BENKEVICH et al., 2012).

A qualidade das montagens foi verificada por meio da ferramenta QUAST (GUREVICH et al., 2013) e a ferramenta "*finisher assembler tool GFinisher*" (gfinisher.sourceforge.net) foi utilizada para combinar as montagens prévias e melhorar a qualidade da montagem dos genomas. Os genomas montados também foram submetidos a anotação genômica por meio da submissão dos dados na plataforma RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology* - <u>https://rast.nmpdr.org/</u>) (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014; BRETTIN et al., 2015).

Os genomas utilizados como referência de rizobactérias, dos gêneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Rhizobium*, foram resgatados do banco de dados GenBank e utilizados nas análises genômicas comparativas. Para avaliar a distância evolutiva entre os genomas, foram utilizadas as ferramentas "fastANI" (disponível em https://github.com/ParBLiSS/FastANI) e o calculador de distâncias genômicas GGDC v2.1 (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013; AUCH et al., 2010a; AUCH et al., 2010b), baseados em identidade de sequência em pares.

4.3 ENSAIOS FENOTÍPICOS

4.3.1 Ensaios de temperatura ótima

Para ensaios de temperatura, estirpes selecionadas foram crescidas em meio NFb malato a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem densidade óptica (D.O.₅₉₅) de 1,0. 10 µL das culturas crescidas foram plaqueados em placas contendo NFb malato sólido e incubadas a 4 °C, 18 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C and 45 °C por sete dias em quadruplicata. O crescimento foi monitorado a cada 24 horas até o final do período proposto. Os resultados foram então analisados por meio do GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, (www.graphpad.com).

4.3.2 Ensaios de salinidade ótima

Para os ensaios de salinidade, estirpes foram crescidas em meio NFb malato a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem densidade óptica (D.O.₅₉₅) de 1,0. Um volume de 2 mL de cultura foi passado para um tubo de 2 mL e lavado três vezes com salina 0,9%, e posteriormente plaqueados em meio NFb sólido com diferentes

concentrações de sal, iniciando de 0% NaCl e sendo complementado com NaCl 20% (v/v) para atingir as concentrações de salinidade de 0%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1-3% (em intervalos de unidade de 1%). Para todas as condições, quadruplicatas foram feitas, e o crescimento foi determinado após sete dias de incubação a 30 °C.

4.3.3 Ensaios de pH ótimo

Para os ensaios de crescimento das estirpes em diferentes valores de pH, o pH inicial do meio NFb malato foi ajustado (4-9 em intervalos de uma unidade de pH) e mantido por meio dos tampões apropriados, de acordo com BOURNAUD et al. (2017), sendo pH 4 (ácido acético 82 mM; acetato de sódio 18 mM); pH 5 (ácido acético 30 mM; acetato de sódio 70 mM); pH 6 (ácido cítrico 18 mM; Na₂HPO₄ 64 mM); pH 7 (ácido cítrico 6 mM; Na₂HPO₄ 87 mM); pH 8 (Na₂HPO₄ 94 mM; NaH₂PO₄ 5 mM); pH 9 (Tris base 100 mM; HCl 10 mM). Os inóculos das estirpes selecionadas foram pré-inoculados em NFb malato a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem D.O.₅₉₅ 1,0. Um volume de 2 mL de cultura foi então lavado três vezes com salina 0,9% (v/v) para retirada de resquícios do meio NFb malato inicial, e inoculado em placas de NFb malato sólido com o pH desejado, em quadruplicadas. O crescimento nos diferentes pHs foi determinado após sete dias de incubação a 30 °C.

4.3.4 Ensaios de crescimento em diferentes fontes de carbono

A utilização de fonte de carbono no crescimento das estirpes selecionadas foi realizada utilizando o kit GN2 Microplate Biolog (www.biolog.com), de acordo com as instruções do fabricante. As estirpes selecionadas foram crescidas em meio NFb malato a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem densidade óptica (D.O.₅₉₅) de 1,0. Um volume de 2 mL de cultura foi então lavado três vezes com salina 0,9% (v/v/) e então ressuspendido em meio NFb sem fontes de carbono, seguindo uma diluição de 10x para então inoculação de 150 μ L no kit GN2. As placas foram então incubadas a 30 °C por cinco dias, e as análises foram realizadas por meio da mensuração da densidade óptica (D.O.₅₉₅) das placas após o quinto dia de crescimento.

4.3.5 Ensaios de resistência a antibióticos

Para os ensaios de resistência a antibióticos, as estirpes foram crescidas em meio NFb malato a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem densidade óptica (D.O.₅₉₅) de 1,0. Um volume de 2 mL de cultura foi passado para um tubo de 2 mL e lavado três vezes com salina 0,9% (v/v), e posteriormente plaqueados em meio NFb sólido suplementado com o antibiótico a ser testado (Tabela 1), em quadruplicata. As

placas foram incubadas por sete dias a 28°C e o crescimento avaliado após este período.

As soluções estoque de antibióticos, a exceção da Tetraciclina (Tc), foram preparados em água ultrapura estéril através de microfiltração (Millipore HAWP 0,2 µM). Estoques de tetraciclina foram preparados em etanol 70%. Todas as soluções estoque foram mantidas a 4 °C.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO INICIAL ¹ (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO FINAL ² (µg/mL)
Ampicilina (AMP)	250	0,25
Cloranfenicol (Cn)	30	0,03
Canamicina (Km)	100	0,10
Estreptomicina (Sm)	80	0,08
Gentamicina (Gn)	25	0,025
Tetraciclina (Tc)	10	0,01

TABELA 1 – Utilização de antibióticos para testes de resistência à antibióticos com estirpes selecionadas de nódulos de *Mimosa* spp.

¹ Concentração estoque do antibiótico; ² Concentração do antibiótico no meio de cultura.

FONTE: o próprio estudo (2022).

4.3.6 Caracterização de Ácidos Graxos

O perfil lipídico das estirpes foi realizado por meio da análise de ácidos graxos extraídos por cromatografia gasosa. Para tal, os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês, *fatty acid methyl ester*) produzidos por reações de metilação, neste caso, metanólise alcalina branda (FERNANDES e CHAER, 2010).

4.3.7 Ensaios de Motilidade

Para os ensaios de motilidade, as estirpes foram crescidas em meio NFb malato a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem densidade óptica (D.O.₅₉₅) de 1,0. Um volume de 2 mL de cultura foi passado para um tubo de 2 mL e lavado três vezes com salina 0,9%, e posteriormente 10 μ L foram inseridos no centro de placas de petri contendo meio NFb malato semissólido 0,25% ágar, em triplicata. As placas foram então incubadas por 72 horas a 28° C e o crescimento foi avaliado após este período, sendo estas fotografadas e observado o crescimento de halo em volta do ponto de inoculação.

4.4 ENSAIOS DE INTERAÇÕES PLANTA-BACTÉRIA

4.4.1 Ensaios de Nodulação

Estirpes isoladas a partir dos nódulos de *Mimosa* spp. foram utilizadas para reinoculação em *Mimosa pudica*, para confirmação de sua capacidade de nodulação. Um sistema contendo dois potes magenta de 300 mL cada foi montado, sendo os potes encaixados verticalmente, para realização dos ensaios. O pote magenta de cima foi preenchido com vermiculita, utilizada como substrato, enquanto o pote de baixo foi preenchido com 200 mL de meio BD (Tabela 2), para irrigação das plantas, sendo papel filtro utilizado para a irrigação (Figura 5a). O sistema foi então esterilizado em autoclave, a 120 °C, 1 atm por 20 minutos.

TABELA 2 – Composição do meio BD utilizado para irrigação em testes de nodulação com estirpes selecionadas de nódulos de *Mimosa* spp.

MEIO BD ¹										
SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO INICIAL ²	CONCENTRAÇÃO FINAL ³							
BASE	QUIMICA	(g/L)	(g/L)							
SOLUÇÃO A	CaCl ₂ .2H ₂ O	294,1	0,147							
SOLUÇÃO B1	KH ₂ PO ₄	136,1	0,068							
SOLUÇÃO B2	K ₂ HPO ₄	174,2	0,087							
SOLUÇÃO C	Fe Citrato	6,7	0,0033							
SOLUÇÃO D	MgSO ₄	123	0,0615							
	K_2SO_4	87	0,0435							
	MnSO ₄	0,34	1,7x10 ⁻⁵							
	H ₃ Bo ₃	0,152	7,6x10 ⁻⁶							
	ZnSO ₄	0,25	1,25x10 ⁻⁵							
	CuSO ₄	0,1	5x10 ⁻⁶							
	CoSO ₄	0,06	3x10 ⁻⁶							
	NaMoO ₄	0,05	2,5x10 ⁻⁶							

¹ pH final deve ser 7, corrigido com NaOH ou HCl; ² Concentração em cada solução após ser autoclavada.

³ Concentração final para 1 litro de meio BD após autoclavado.

FONTE: o próprio estudo (2022).

4.4.2 Quebra de dormência de sementes de M. pudica

A dormência das sementes de *M. pudica* foi quebrada por meio da exposição a ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos, subsequentemente sendo lavadas em água corrente por 5 minutos. As sementes então foram imersas em hipoclorito de sódio 6% (v/v) por 15 minutos, lavadas cinco vezes com água destilada estéril, e transferidas para placa de petri com meio BD ágar 0,5% com 1 cm de distância entre cada semente. A

placa foi então embrulhada em papel alumínio e incubada a 30 °C por 48 horas. Após este período, as sementes germinadas foram então transplantadas para o sistema com vermiculita estéril em fluxo laminar (Figura 5b), sendo o sistema então fechado e levado para casa de vegetação por 72 horas para aclimatação, antes da inoculação das estirpes.

4.4.3 Inoculação de estirpes de interesse

A estirpe *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424, conhecida por sua capacidade de nodular *Mimosa pudica* (CHEN et al., 2008), foi utilizada como controle positivo para os ensaios de nodulação. As estirpes selecionadas e o controle positive foram previamente inoculadas em 5 mL de meio YMB a 28 °C, 120 rpm, por 14-16 horas até atingirem densidade óptica (D.O.₅₉₅) de 0,7. 1 mL de cultura foi utilizado, lavado três vezes com salina 0,9% e diluído 10 vezes com salina 0,9%. 1 mL da diluição foi então utilizado para inoculação nas sementes germinadas em fluxo laminar, para garantir a esterilidade do sistema. O ensaio para cada estirpe selecionada foi feito em quadruplicata e, após a inoculação, a superfície do sistema foi coberta com grânulos de vidro estéreis para evitar contaminação (Figura 5c), e retornado a casa de vegetação, com temperatura (34 °C) e umidade controladas (70%).

FIGURA 5 - Sistema de cultivo¹ de *Mimosa pudica* em condições estéreis para ensaios de nodulação.



¹ Sistema magenta para ensaio de nodulação (a); semente de *Mimosa pudica* plantada no sistema (b); inoculação da estirpe de interesse após 72 h de aclimatação da semente e adição de grânulos de vidro estéreis (c).

FONTE: o próprio estudo (2022).

4.4.4 Coleta e isolamento das estirpes dos nódulos de *M. pudica*

O sistema com as plantas de *M. pudica* foi acompanhado por 60 dias, sendo as plantas regadas com meio BD quando necessário, em fluxo laminar, por meio do reabastecimento de meio BD no pote magenta inferior. Após este período, as plantas foram coletadas, sendo as raízes lavadas em água destilada estéril, pesadas e medidas, juntamente à parte aérea, e então secadas em sacos de papel por 7 dias em estufa a 80 °C, sendo posteriormente pesadas novamente. Os nódulos provenientes das raízes foram contados e pesados, e desinfestados por imersão em etanol 95% por 30 segundos, seguindo de 60 segundos em hipoclorito de sódio 6%, lavados quatro vezes com água destilada estéril, e então triturados com bastão de vidro estéril e plaqueados em placas de petri contendo meio YMA sólido. As placas foram então incubadas a 28 °C por dois a sete dias, e as colônias crescidas foram isoladas e identificadas por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 5.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS
 - 5.1.1 Filogenia dos genes 16S rRNA e recA

Um total de 345 sequências referência do gene 16S rRNA foram agrupados com 189 sequências de 16S rRNA de estirpes isoladas (Anexo 1) (SILVA, 2018; MOREIRA, 2018) a partir de nódulos de *Mimosa* spp. (Figura 6; Tabela 3), utilizando a ferramenta CD-HIT com 99% de identidade entre as sequências. As sequências referência incluíram estirpes tipo de oito gêneros relacionados (*Cupriavidus, Burkholderia, Paraburkholderia, Herbaspirillum, Rhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium* e *Ensifer* sp.), obtidos a partir da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, https://www.bacterio.net; PARTE, A., 2018; PARTE, A. et al., 2020) em outubro de 2021.

As 535 sequências foram agrupadas em 229 grupos, dos quais 207 (90,3%) foram formados por sequências únicas, e 22 (9,6%) incluíram duas ou mais sequências. Destes últimos, 11 grupos incluíram sequências de estirpes isoladas juntamente com sequencies referência dos gêneros *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia*, permitindo uma aproximação taxonômica para estes isolados. Três grupos foram identificados como próximos a *P. caribensis* (VANDAMME et al., 2002), *P. mimosarum* (CHEN et al.; 2006), and *P. peleae* (WEBER et al., 2017), incluindo 18, 15, e 14 isolados, respectivamente. Destas, apenas as primeiras duas espécies já foram descritas como simbiontes de *Mimosa* spp.

Os 11 grupos restantes, referentes aos 22 grupos iniciais, foram formados apenas por estirpes de isolados, totalizando 83 sequencias de *16S rRNA*, indicando potenciais novas espécies de rizóbios. Para estes grupos, a identificação taxonômica foi confirmada por meio da ferramenta BLASTn, contra o banco de dados do NCBI, de forma que resultados obtidos mostram que as estirpes pertencem aos gêneros *Cupriavidus* e *Paraburkholderia*. Sete grupos, do gênero *Paraburkholderia* foram selecionados (Tabela 4) para as próximas análises.

FIGURA 6 - Local de amostragem de plantas de *Mimosa* spp. coletas por Silva (2018) e Moreira (2018) nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil.



FONTE: Adaptado de Silva (2018) e Moreira (2018).

Local de coleta	Ano	Planta hospedeira	Latitude ¹	Longitude	Altitude (m)
Morretes 14	2014	Mimosa pudica	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W	23
Morretes 14	2014	Mimosa bimucronata	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W	23
Morro Inglês 14	2014	Mimosa pudica	25°26'43.4"S	48°48'36.3"W	22
Morro Inglês 15	2015	Mimosa pudica	25°34'17.6"S	48°39'16.9"W	50
M. Canal 14	2014	Mimosa congestifolia	25°30'55"S	48°58'53"W	1359
M. Canal 14	2014	Mimosa congestifolia	25°30'55"S	48°58'53"W	1359
M. Canal 16	2016	Mimosa congestifolia	25°30'52.6" S	48°59'16.8" W	1313
M. Canal 16	2016	Mimosa pseudocallosa	25°30'55" S	48°58'53" W	1359
M. Canal 17	2017	Mimosa congestifolia	25°30'52.6" S	48°59'16.8" W	1313
São Luiz do Purunã 14	2014	Mimosa gymnas	25°28'20.6"S	49°38'26.0"W	1203
São Luiz do Purunã 14	2014	Mimosa dolens	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W	966
São Luiz do Purunã 17	2017	Mimosa dolens	25º28'10.7"S	49°38'38.1"W	1172
Cânion Faxina 18	2018	Mimosa furfuracea	25°27'35.2"S	49°40'07.6"W	1095
Rec Pap 14	2014	Mimosa pilulifera	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W	974
Rec Pap 14	2014	Mimosa lanata	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W	973
Rec Pap 14	2014	Mimosa dryandroides	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W	966
Rec Pap 14	2014	Mimosa dolens	25°28'35.0"S	49°47'10.5"W	971
Rec Pap 17	2017	Mimosa dryandroides	25°28'07.5"S	49°46'25.2"W	987
Rec Pap 18	2018	Mimosa daleoides	NA	NA	NA
Rec Pap 18	2018	Mimosa pilulifera	NA	NA	NA
Rec Pap 18	2018	Mimosa dolens	NA	NA	NA
PG 14a	2014	Mimosa regnellii	25°09'16.9"S	50°03'21.6"W	928

TABELA 3 – Plantas de *Mimosa* spp. amostradas por Silva (2018) e Moreira (2018) nos estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil.

PG 14b	2014	Mimosa paranapiacabae	25°08'40.6"S	49°57'22.9"W	1023
PG 14c	2014	Mimosa flocculosa	25°10'51.0"S	50°04'31.1"W	826
Quiriri 16	2016	Mimosa hirsutula	26°1'46.36"S	48°57'33.62"W	1538
Quiriri 16	2016	Mimosa murex	26°1'46.36"S	48°57'33.62"W	1538
Quiriri 16	2016	Mimosa piscatorum	26°1'46.36"S	48°57'33.62"W	1538
Quiriri 16	2016	M sp1	26°1'46.36"S	48°57'33.62"W	1538
Quiriri 16	2016	M sp2	26°1'46.36"S	48°57'33.62"W	1538
Quiriri 16	2016	Mimosa lanata	26°1'46.36"S	48°57'33.62"W	1538
Blumenau 16	2016	Mimosa pudica	26°53'39" S	49°4'19" W	21
Blumenau 16	2017	Mimosa pudica	NA	NA	21

¹ Latitude "NA" representa dados ausentes.

FONTE: adaptado de Silva (2018) e Moreira (2018).

Apenas os grupos *clstr0013* e *clstr0049* incluem isolados provenientes de uma única espécie de *Mimosa* (*M. piscatorum* e *M. scabrella*, respectivamente), o que pode indicar espécies de rizóbios hospedeiro-específico, encontrados unicamente nestas espécies de leguminosas. Uma possibilidade para estes resultados pode ser relacionada à sinalização molecular entre as rizobactérias e a *Mimosa* sp. em questão, de forma que a excreção de flavonoides e a ativação dos genes *nod* seja mais favorecida na relação entre estes dois organismos em específico do que para outros simbiontes (PINDI et al., 2020).

Outra possibilidade também, é a ausência de um maior número de regiões e plantas amostradas e outros estudos regionais publicados, para maiores comparações, já que as populações de rizobactérias variam intensamente de acordo com características geográficas, como perfil de solo (pH, salinidade, por exemplo) e hospedeiros disponíveis (BENNY et al., 2015; LAMMEL et al., 2018).

TABELA 4 - Grupos baseados em sequências de *16S rRNA* de estirpes isoladas a partir dos nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes tipo referência (NCBI) para o gênero *Paraburkholderia*.

Grupos	n° seq¹	Ref NCBI ²	lsolado ³	Hospedeiro	Local de coleta
			88.12	M. daleoides	Recanto dos Papagaios
		Sem correspondência	BN5.2	M. dolens	Recanto dos Papagaios
clstr0001	21	(<i>Paraburkholderia</i> sp.	90.3	M. pilulifera	Recanto dos Papagaios
		nov)			
			RP2.3.1	M. dryandroides	Recanto dos Papagaios
			CF13	M. furfuracea	Cânion Faxina
			11.13	M. murex	Quiriri
clstr0003	17	Sem correspondência	6.1	M. hirsutula	Quiriri
		(Paraburkholderia sp.	MC3.2	M. congestifolia	Morro do Canal
		nov)			
			7.11	Mimosa sp.	Quiriri

			9.2	M. murex	Quiriri
clstr0006	15	P. paleae	7.1	Mimosa sp.	Quiriri
			MC4	M. congestifolia	Morro do Canal
			6.3	M. hirsutula	Quiriri
clstr0010	13	Sem correspondência	6.2	M. hirsutula	Quiriri
		(Paraburkholderia sp.	7.3	Mimosa sp.	Quiriri
		nov)			
			10.7	M. piscatorum	Quiriri
clstr0013	11	Sem correspondência	10.15.1	M. piscatorum	Quiriri
		(Paraburkholderia sp.	10.15.2	M. piscatorum	Quiriri
		nov)			
			88.16	M. daleoides	Recanto dos Papagaios
clstr0024	4	Sem correspondência	89.3	M. dolens	Recanto dos Papagaios
		(Paraburkholderia sp.	RP7.2.2	M. dryandroides	Recanto dos Papagaios
		nov)			
clstr0049	2	Sem correspondência	MP1.1	M. scabrella	Morro da Palha
		(Paraburkholderia sp.	MP2.2	M. scabrella	Morro da Palha
		nov)			

¹ Número de sequencias de *16S rRNA* de isolados correspondente a cada grupo; ² Grupos sem correspondência com banco de dados foram definidos como possíveis espécies novas; ³ Isolados representantes dos referentes grupos, utilizados para análises posteriores.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Os grupos restantes são formados por diferentes isolados de diferentes espécies de plantas (incluindo espécimes coletadas no mesmo local e/ou locais diferentes) (Tabela 4), indicando que ou molecularmente estes simbiontes são capazes de ativar seus genes necessários à nodulação em exposição à variados flavonoides, ou as leguminosas referentes a estes beta-rizóbios têm a capacidade de recrutar diversas populações de microrganismos, se caracterizando como hospedeiras promíscuas (LIRA et al., 2015; DONIE, J. ALLAN, 2010).

Levando em conta que o gene *16S rRNA* apresenta baixa resolução para avaliar questões taxonômicas (VETROVSKI e BALDRIAN, 2013; PARKS et al., 2019; RAHIMLOU et al., 2021), o gene *housekeeping recA* foi amplificado e sequenciado para, no mínimo, uma estirpe por grupo (Anexo 2). As sequências dos genes *16S rRNA-recA* dos isolados e de estirpes referência foram então utilizados para construir uma árvore filogenética, por meio dos alinhamentos concatenados. A Figura 7 revela a relação das estirpes isoladas com espécies referências próximas do gênero *Paraburkholderia*.

FIGURA 7 - Árvore filogenética¹ baseada nos alinhamentos concatenados dos genes *16S rRNA* e *recA* amplificados de estirpes isoladas e estirpes referência de rizóbios.



0.02

¹A história evolutiva foi calculada utilizando o método Neighbor-Joining. A soma do comprimento do ramo para árvore ótima = 0,97580752 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostradas ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Jukes-Cantor e estão nas unidades de número de substituições de bases por sítio. As análises envolveram 47 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminadas, resultando num total de 419 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7.

* Estirpes com genoma total sequenciado disponível.

FONTE: O próprio estudo (2022).

A árvore filogenética aponta uma proximidade entre quatro grupos de isolados. O filogrupo "A" é formado por três grupos (*clstr0003*, *clstr0006*, *clstr0010*), de forma que os isolados de cada grupo se misturam entre si, não havendo uma definição dentro do ramo. Esses resultados podem indicar uma divergência com as análises prévias de agrupamento dos isolados por meio do gene *16S rRNA* através da ferramenta CD-HIT em relação aos métodos utilizados para a construção da árvore.

Estes resultados conflitantes podem ser devido à baixa resolução de espécie para o gene *16S rRNA* quando os clusters foram gerados, ou até mesmo problemas não resolvidos com os dados brutos, como por exemplo, baixa qualidade de sequenciamento. De qualquer forma, apenas um dos três grupos contém genoma sequenciado (clstr0006), e assim, análises mais aprofundadas são necessárias.

Um problema similar pode ser notado como filogrupo "D", no qual dois outros grupos (*clstr0001* e *clstr0024*) se encontram jutos. Diferentemente do filogrupo "A", estes dois apresentam genomas sequenciados, e análises genômicas indicam uma grande similaridade entre eles (Tabela 8). Desta forma, por mais que ambos tenham sido agrupados separadamente, baseados em suas sequências de *16S rRNA* pelo método CD-HIT, as análises taxonômicas, baseadas em sequência genômica, de maior resolução, indicam que estas estirpes estão mais próximas de pertencerem a uma mesma espécie.

Filogrupos "B" e "C" se mostram bem resolvidos, sendo cada um formado por apenas um grupo baseado no gene *16S rRNA* (*clstr0049* e *0013*, respectivamente). Para o filogrupo "B", uma sequência genômica está disponível e análises mostram uma relação próxima com *Paraburkholderia nodosa*, uma espécie já bem caracterizada como simbionte do gênero *Mimosa* (CHEN et al., 2007). Para o filogrupo "C", as análises genômicas mostram um grupo bem definido com apenas isolados provenientes de nódulos de *M. piscatorum*, e filogeneticamente relacionados com *P. dipogonis* e *P. phymatum*, resultados confirmados também pelas análises filogenéticas da árvore de *16S rRNA-recA*.

5.1.2 Filogenia de genes da FBN e de nodulação, nifH e nodC

Paraburkholderia spp. tem sido reconhecido como um dos principais gêneros capazes de promover a formação de nódulos e o crescimento de inúmeras espécies de leguminosas (VIO et al., 2020). Um dos principais meios de confirmar a capacidade de promoção de crescimento vegetal se dá pelo gene *nifH*, que tem papel fundamental na fixação biológica do nitrogênio (DE MEYER et al., 2016), e por meio do gene *nodC*, que participa ativamente na indução da formação dos nódulos em leguminosas, onde a FBN majoritariamente ocorre (STRENG et al., 2011).

Dessa forma, o gene *nifH* foi amplificado e sequenciado para estirpes de interesse dos Filogrupos "A", "C" e "D" (Anexo 2), formados por meio da filogenia concatenada dos genes *16S rRNA-recA* (Figura 7). A construção de uma árvore filogenética foi realizada a fim de evidenciar a relação evolutiva entre as estirpes (Figura 8). A presença do gene para todos os isolados confirma a capacidade de fixar nitrogênio pela presença de um complexo nitrogenase funcional e, embora a filogenia de genes da FBN não necessariamente revele as relações filogenéticas dos procariotos, devido aos inúmeros eventos de transferência lateral gênica (GONZÁLEZ et al., 2019; REHIMLON et al., 2021), o padrão de agrupamento visto em análises filogenéticas anteriores se mantém.

O mesmo ocorre para *nodC*, utilizado para confirmar a capacidade de nodulação junto a ensaios de reinoculação em leguminosas. O surgimento da capacidade de bactérias diazotróficas interagirem simbioticamente com leguminosas se deu em um evento único, mas atualmente sabe-se que a maioria dos grupos taxonômicos de rizóbios adquiriram e perderam várias vezes os genes necessários para a nodulação (VELVEZ, et al., 2017; GARRIDO-OBTER et al., 2018; STRENG et al., 2011). *nodC* foi sequenciado para estirpes dos filogrupos "A", "C" e "D" (Figura 7) (Anexo 2) a fim de confirmar o potencial para a formação de nódulos em leguminosas, assim como estimar taxonomicamente posição das estirpes por meio de uma árvore filogenética (Figura 9).

FIGURA 8 – Árvore filogenética¹ do gene *nifH* para as estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes referência de rizóbios.



0.050

¹A história evolutiva foi calculada utilizando o método Neighbor-Joining. A soma do comprimento do ramo para árvore ótima = 1,00675744 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostradas ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Jukes-Cantor e estão nas unidades de número de substituições de bases por sítio. As análises envolveram 31 sequências nucleotídicas e todas as posições de códon foram incluídas. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência, resultando num total de 1.443 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7.

FONTE: o próprio estudo (2022).

FIGURA 9 – Árvore filogenética¹ do gene *nodC* para as estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes referência de rizóbios.



0.05

¹A história evolutiva foi calculada utilizando o método Neighbor-Joining. A soma do comprimento do ramo para árvore ótima = 1,34962314 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostradas ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Poisson (ZUCKERKANDL e PAULING, 1965) e estão nas unidades de número de substituições de aminoácidos por sítio. As análises envolveram 45 sequências de aminoácidos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência, resultando num total de 1225 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Assim como nas filogenias anteriores (*nifH* e 16S *rRNA-recA*) as estirpes mantém o padrão de agrupamento, com *clstr0003*, *clstr0006* e *clstr0010* formando o filogrupo "A", *clstr0013* formando o filogrupo "C" e *clstr0001* e *clstr0024* formando o filogrupo "D". Estas análises reforçam a posição filogenética das estirpes e corroboram para grupos bem definidos e de prováveis espécies únicas, com as mesmas relações filogenéticas próximas de rizobactérias referência.

Quando comparadas entre si, as filogenias dos genes *nifH* e *nodC* conservam as posições dos isolados dentro de seus ramos e próximos às estirpes referências de outras betaproteobactérias (Figura 10). Vê-se dois grupos distintos de isolados quando levando em consideração os dois genes, de forma que estirpes provenientes de nódulos *Mimosa murex*, *Mimosa hirsutula* e *Mimosa* sp., amostradas em Santa Catarina, aparentemente têm a mesma história filogenética, ainda que com uma leve alteração na posição dentro dos ramos para a estirpe 7.1 e 6.7, indicado na figura com linhas tracejadas. Para este primeiro grupo, as espécies de rizóbios mais próximas também se mantém nas duas árvores, sendo *P. mimosarum* e *P. nodosa*, respectivamente.

FIGURA 10 – Filogenia comparativa¹ entre os genes *nifH* e *nodC* de para as estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. e estirpes referência de rizóbios.



¹ Árvores filogenéticas provenientes das Figuras 8 e 9. Destacado em cores, estirpes provenientes da mesma espécie de *Mimosa* e mesmo local de coleta.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Já o segundo grupo de isolados se define principalmente pelo local de coleta, com majoritariamente estirpes de Recanto dos Papagaios (PR), e apenas duas estirpes do Quiriri. Têm como principal estirpe referência *Paraburkholderia tropica*, de forma que algumas espécies referência utilizadas na filogenia do gene *nifH* não apresentam *nodC* em seus genomas, como é o caso de *P. phytofirmans.*

Com uma diversidade maior de plantas amostradas, as posições filogenéticas dentro dos ramos também variam, com 10.7 e 10.11.2 no ramo mais externo para o gene *nodC* e as estirpes 89.3 e RP2.3.1 mais internamente. Esse rearranjo pode ser devido a diferença no banco de dados de sequências utilizado para cada árvore (Anexo 2) e, também nos próprios métodos utilizados para a construção das mesmas. Ainda assim, os dois grupos formam-se bem definidos dentro das duas filogenias, separados de suas espécies de rizóbios mais próximas por ramos bem definidos, sem grandes alterações na disposição geral dentro das árvores.

5.2 CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS

Sete genomas distribuídos em cinco grupos (análises CD-HIT, Tabela 4) foram sequenciados, e análises genômicas após a montagem e refinamento dos dados mostraram que o tamanho dos mesmos (em pares de base) é compatível com o esperado para o gênero e para as espécies de *Paraburkholderia* sp. próximas, como *P. guartelaensis* (PAULITSCH et al., 2019) e *P. nodosa* (CHEN et al., 2007), assim como o conteúdo G + C, acima de 60 mol% (VIO et al., 2020) (Tabela 4).

De maneira geral, o genoma de espécies representantes do gênero *Paraburkholderia* tem um maior número de pares de base (pb) se comparado a outros genomas bacterianos, com média de 8,3 milhões de pb, o que se confere como um dos principais fatores da diversidade e capacidade de colonização dos mais diversos nichos ecológicos por este táxon, assim como para toda a família *Burkholderiaceae* (diCENZO e FINAN, 2017; MANNAA et al., 2019).

Grupo	Isolado	Nº contigs > 500pb	N ₅₀	Maior contig (pb)	G + C (mol%)	Tamanho (pb)
olotr0001	88.12	52	239.053	773.991	64.02	7.091.781
CISTIOOOT	BN5.2	53	196.875	580.333	64.08	6.858.371
-1-1-0000	9.2	298	81.196	355.398	63.40	9.326.627
CISTIOOOO	7.1	346	75.187	310.515	63.40	9.366.212
clstr0013	10.7	152	272.534	806.563	61.90	8.838.731
clstr0024	89.3	63	202.732	629.410	63.83	7.126.779
clstr0049	MP1.1	83	183.988	698.738	64.07	9.169.058
P. guartelaensis	CNPSo 3008 [⊤]	173	172.567	-	63.62	9.532.701

TABELA 5 - Características genômicas de estirpes isoladas a partir dos nódulos de Mimosa spp.1

P. nodosa	Br3437 [⊤]	-	-	-	62.80	9.0Mb

¹As características genômicas foram obtidas a partir das montagens de rascunhos das sequências genômicas.

FONTE: o próprio estudo (2022).

A fim de confirmar as estirpes selecionadas para o sequenciamento genômico total, o gene 16S rRNA extraído do genoma de cada estirpe foi comparado com o 16S rRNA amplificado por meio de PCR convencional inicialmente, utilizado nas análises de CD-HIT e filogenia (Tabela 6). A análise foi realizada por meio da ferramenta BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov), alinhando as duas sequencias na plataforma e comparando suas identidades (Anexo 3). Todas as estirpes obtiveram uma correspondência maior do que 99,3% entre as sequências, confirmando a procedência do DNA genômico sequenciado.

TABELA 6 – Correspondência entre as sequências de *16SrRNA* amplificadas por meio de PCR convencional e as sequencias extraídas dos genomas sequenciados das estirpes isolados de *Mimosa* spp.

Estirpe	<i>16S rRNA</i> (pb) por PCR convencional	<i>16S rRNA</i> (pb) extraído do genoma	ldentidade (%) BLASTn
10.7	1366	1376	99,27
MP1.1	1395	1399	99,71
7.1	1373	1378	99,64
9.2	1534	1534	100
88.12	1398	1400	99,64
89.3	1350	1356	99,56
BN5.2	1383	1386	99,78

FONTE: o próprio estudo (2022).

A sequência genômica de estirpes isoladas e estirpes referência do gênero *Paraburkholderia* foi realizada para determinar a identidade nucleotídica média (*"average nucleotide identity - ANI"*), alternativamente à hibridização DNA-DNA (DDH), visto que valores de ANI de 95-96% são comparáveis a valores de 70% em análises de DDH (RICHTER e ROSSELLÓ-MÓRA, 2009), para determinar se as estirpes isoladas estão fora do limite de espécie, em relação às espécies já descritas até o momento.

Os genomas das estirpes 9.2 e 7.1 (*clstr0006*, Filogrupo "A") e MP1.1 (*clstr0049*, Filogrupo "B") se mostraram próximas de *P. nodosa* DSM 21604, *P. nodosa* CNPSo 1341, *P. guartelaensis* CNPSo 3008^T, *P. silvatlantica* LMG 23149^T e *P. phytofirmans*

PsNJ^T. Por outro lado, as estirpes 88.12, BN5.2 e 89.3 (*clstr0001* e *clsrt0024*, Filogrupo "D") estão mais relacionadas com estirpes de *P. tuberum*, *P. sprentiae* e *P. monticola* JC2948^T. Destas, a exceção da estirpe MP1.1, nenhuma apresentou resultados acima do limite de definição de espécie e, dessa forma, as estirpes dos filogrupos "A" e "D" (Figura 7) se reiteram como possíveis novas espécies do gênero *Paraburkholderia*, visto que os resultados para ANI foram abaixo de 95-96% (Tabela 7).

Valaraa da ANU (0/)1		Estirpes isoladas de Mimosa spp.								
valores de ANI (%)'		Grupo A		Grupo B		Grupo D	1	Grupo C		
Estirpes referência	Nº acesso (NCBI)	9.2	7.1	MP1.1	88.12	89.3	BN5.2	10.7		
P. nodosa DSM 21604	NZ_JAFA00000000.1	94.42	94.42	96.76	81.57	81.51	81.61	81.05		
P. nodosa CNPSo 1341	NZ_MCNV0000000.1	93.24	93.22	94.11	81.61	81.49	81.63	81.00		
<i>P. guartelaensis</i> CNPSo 3008 [⊤]	NZ_XMOD0000000.1	93.61	93.61	93.94	81.58	81.52	81.62	80.78		
P. silvatlantica SRMrh-85	NZ_JACHVZ00000000.1	92.84	92.80	93.11	81.63	81.53	81.59	80.93		
<i>P. phytofirmans</i> PsJN [⊤]	NC_010681.1	92.84	92.80	93.11	81.63	81.53	81.59	96.73		
P. dipogonis ICMP 19430 [™]	NZ_SNVI0000000.1	77.88	77.80	78.20	83.49	83.54	83.47	95.23		
P. tuberum DUS 833	NZ_FNKX0000000.1	81.45	81.39	81.53	92.53	92.50	92.60	84.68		
P. sprentiae WSM 5005 [⊤]	NZ_AXBN0000000.1	81.30	81.30	81.44	91.31	91.37	91.43	84.53		
<i>P. monticola</i> JC 2948 [⊤]	NZ_LRBG00000000.1	81.29	81.21	81.48	91.56	91.23	91.26	84.85		

TABELA 7 - Valores de ANI para estirpes isoladas de nódulo de *Mimosa* spp. em comparação com genomas referência de *Paraburkholderia* sp.

¹Os valores acima de 95% são mostrados em negrito. Os valores de ANI foram obtidos através da comparação entre os rascunhos de sequências genômicas de cada estirpe isolada, obtidas neste trabalho, com as sequências genômicas de cada estirpe referência, disponível no banco de dados do NCBI. As comparações foram realizadas com o programa fastANI (https://github.com/ParBLiSS/FastANI) utilizando os parâmetros padrão e incluindo nas análises o conjunto de todas as sequências disponíveis para cada genoma, utilizando apenas contigs acima de 500 pb.

FONTE: o próprio estudo (2022).

O genoma da estirpe 10.7 (*clstr0013*, Filogrupo "C") se mostrou mais próximo das espécies *P. phytofirmans* PsNJ^T (SESSITSCH et al., 2005) e *P. dipogonis* ICP 19430^T (SHEU et al., 2015) com valores de ANI correspondentes a 96,79% e 95,23%, respectivamente. Estes valores estão no limiar de delimitação de espécie, e indicam uma possível subespécie destas betaproteobactérias. Os valores para análises utilizando o GGDC também sugerem que esta estirpe está intimamente relacionada com *P. phytofirmans* e *P. dipogonis*, com valores de 66,10% e 63,70% respectivamente, não ultrapassando, porém, o limite de definição de espécie para esta análise, estimado em 70% de identidade entre os genomas.

Diversos são os estudos que discutem o real limite de identidade entre genomas para que uma nova espécie seja definida (PALMER et al., 2020; MURRAY et al., 2021; JAIN et al., 2018), de forma que não há um consenso aos quais valores de ANI devem ser utilizados para que espécies novas sejam delimitadas (RODRIGUEZ-R et al., 2021). De maneira geral, uma similaridade entre sequências de *16S rRNA* acima de 98,7% e uma identidade entre genomas acima 95-96% em análises de ANI e 70% em análises GGDC são utilizadas para inferir que uma estirpe pertence a uma espécie já descrita (CHUN et al., 2018).

É visto, porém, que uma série de análises preliminares devem ser realizadas para definir o limite de identidade ideal de ANI para o táxon estudado, podendo este limite variar entre gêneros, levando em consideração a diversidade intraespecífica de cada grupo. Estes resultados então devem ser considerados num panorama da taxonomia polifásica, levando em consideração não só características genômicas, mas também morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e filogenéticas (PALMER et al., 2020). Um exemplo pode ser visto em espécies do gênero *Bradyrhizobium*, no qual *B. elkanii* e *B. pachyrhizi* são genomicamente muito semelhantes a estirpes de *B. japonicum*, porém divergem em distribuição geográfica, espectro de hospedeiros e em aspectos fenotípicos (PALMER et al., 2020; RAMIREZ-BAHENA et al., 2009).

Paraburkholderia phytofirmans PsJN, mais próxima geneticamente da estirpe 10.7 (96,79% ANI; 66,1% GGDC) foi originalmente isolada da superfície de raízes de cebola em solos da Holanda, e é conhecida por sua grande capacidade de promoção de crescimento vegetal em vários cultivares de interesse, como milho, cana de açúcar e arroz (NAVED et al., 2015). Embora *P. phytofirmans* esteja presente principalmente na rizosfera e endofiticamente nas raízes de seus hospedeiros (SESSITSCH et al., 2005), não há nenhuma descrição da capacidade de induzir a formação de nódulos em leguminosas, ainda que possa ser encontrada junto a outras rizobactérias nodulantes (RAMIREZ et al., 2018), de forma que os genes *nod* não estão presentes no seu genoma (LIU et al., 2014).

Diferentemente, *Paraburkholderia dipogonis* ICP 19430^T, foi originalmente encontrada nodulando a leguminosa *Dipogon lignosus* em solos da Nova Zelândia e Austrália, tendo como principais estirpes próximas *P. caledonica* e *P. phytofirmans*. A espécie é amplamente conhecida por sua capacidade de nodulação (SHEU et al., 2015), sem ocorrência, porém, em leguminosas endêmicas do Brasil, como o gênero *Mimosa*. Em comparação com *P. phytofirmans*, a similaridade entre as sequências de *16Sr rRNA* das duas espécies se encontra acima do limite de espécie, considerado 98.7% (YARZA et al., 2014), sendo entre 99,0 e 99,5% (SHEU et al., 2015). Quando realizadas análises de identidade nucleotídica média (ANI) e de GGDC, os resultados se encontram no limite de valores para diferenciação entre espécies (95-96% ANI; 70% GGDC) sendo estes 95,81% (ANI) e 69% (GGDC).

Ao comparar suas posições na filogenia dos genes *16S rRNA-recA* (Figura 7), as estirpes também são as mais relacionadas ao isolado 10.7, ressaltando, porém, que *P. dipogonis* se mostra como a referência mais próxima, seguida por *P. phytofirmans*. Tal resultado difere dos atribuídos as análises de ANI e GGDC, nos quais *P. phytofirmans* é geneticamente mais semelhante à estirpe 10.7 quando comparada a *P. dipogonis*, com valores de 96,73% e 92,23% (ANI) e 66.10% e 63.70% (GGDC), respectivamente. Dessa forma, vê-se uma falta de resolução filogenética entre as estirpes por meio dos genes *16S rRNA* e *recA* quando juntos aos resultados de comparações genômicas, até mesmo entre as espécies já descritas, como já citado anteriormente quando vistos os valores de ANI e GGDC.

Desta forma, a estirpe 10.7, isolada de nódulos de *Mimosa piscatorum* em Santa Catarina, se define provavelmente como uma nova espécie de rizobactéria, visto que sua proximidade com *P. dipogonis* em relação a identidade genômica se encontra no limite para as análises de ANI e abaixo do limite para as análises de GGDC. Ainda, por mais que haja uma íntima relação com *P. phytofirmans*, o que pode indicar que este isolado seja uma possível subespécie do diazotróficos já descrito, não há descrição desta espécie capaz de nodular leguminosas, e, ainda menos, espécies de *Mimosa* endêmicas brasileiras, principalmente pela ausência do gene *nodC* em seu genoma (LIU et al., 2014).

Análises de ANI e GGDC também foram realizadas entre os genomas das estirpes isoladas e, embora o agrupamento por meio das sequências do gene *16S rRNA* tenha gerado dois diferentes grupos (*clstr0001* e *clstr0024*) para as estirpes 88.12, BN 5.2 e 89.3, estes resultados adicionais mostram que estas estirpes provavelmente pertencem a mesma espécie, visto que tanto valores para ANI (95%) quanto para GGDC (70%) resultaram acima do nível de limite de delimitação de espécies (Tabela 8). Assim, estas análises genômicas suportam os resultados filogenéticos encontrados para o Filogrupo "D" (Figura 7), no qual estas estirpes se encontram agrupadas.

TABELA 8 - Valores de ANI e GGDC para a comparação entre os genomas sequenciados das estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp.

	Cls	str0001	Clstr0024	Clstr0024 Clstr0006		Clstr0049	Clstr0013
ANI/GGDC	88.12 BN5.2 8		89.3	9.2	7.1	MP1.1	10.7

88.12	-	84.3	82.7	20.3	20.3	20.8	29.7
BN5.2	98.08 ¹	-	83.6	20.2	20.2	20.9	30.30
89.3	98.15	98.01	-	20.2	20.2	21.1	30.0
9.2	81.56	81.55	81.47	-	99.9	63.7	18.40
7.1	81.55	81.54	81.48	99.97	-	63.5	18.40
MP1.1	81.68	81.74	81.69	94.43	94.43	-	18.10
10.7	83.46	83.74	83.45	78.32	78.37	78.10	-

¹Em Vermelho valores acima do limite de delimitação de espécie; em azul, valores abaixo do limite de delimitação de espécie, indicando prováveis espécies diferentes.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Por último, a estirpe 10.7 (*clstr0013*, Tabela 4; Filogrupo "C", Figura 7) não apresentou resultados de proximidade com nenhuma das outras estirpes. Isso corrobora com a sua posição na árvore filogenética concatenada dos genes *16S rRNA-recA* e análises de agrupamento pelo gene *16S rRNA* com o software CD-HIT, nos quais a estirpe, junto com outros isolados provenientes dos nódulos do mesmo hospedeiro (*M. piscatorum*), se definem como um grupo isolado das outras rizobactérias.

Desta forma, dentre as estirpes isoladas dos nódulos de *Mimosa* spp. da região sul brasileira, pelo menos três grupos de isolados puderam ser identificados como possíveis espécies novas, bem delimitadas por meio de análises genômicas e filogenéticas (Figura 7). *Paraburkholderia* spA, referente ao filogrupo "A", com a estirpe 9.2 sendo considerada a estirpe tipo; *Paraburkholderia* spC, referente ao filogrupo "C", com a estirpe tipo sendo o isolado 10.7; e *Paraburkholderia* spD, referente ao filogrupo "D", com a estirpe 88.12 sendo considerada a estirpe tipo.

5.3 ENSAIOS FENOTÍPICOS

As novas estirpes definidas a partir dos ensaios filogenéticos e análises genômicas, *Paraburkholderia* spA, spC e spD, foram selecionadas para ensaios de crescimento ótimo em diferentes temperaturas, pH e salinidade, a fim de definir as melhores condições de crescimento. As estirpes selecionadas variaram em número de acordo com os ensaios, mas, ao menos a estirpe tipo para cada nova espécie foi testada para todas as condições.

Ainda, foram incluídas nos testes estirpes tipo para as espécies do gênero *Paraburkholderia* mais próximas, como estabelecido nas análises filogenética e genômicas (Figura 7; Tabela 7), sendo elas *P. guartelaensis* CNPSo 3008^T (PAULITSCH, et al., 2019), *P. franconis* CNPSo 3157^T, *P. atlantica* CNPSo 3155^T (PAULITSCH, et al., 2020), e *P. phymatum* (VANDAMME et al., 2002). Outras estirpes tipo mão foram testadas por não estarem disponíveis na data do estudo.

Para cada ensaio, os resultados foram analisados através do crescimento das estirpes nas diferentes condições testadas, utilizando uma escala variando de 0 (ausência de unidades formadoras de colônias (UFC)) a 4 (crescimento sem distinção UFC) (Figura 11).

FIGURA 11 - Exemplificação do crescimento¹ das estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. para ensaios fenotípicos.



¹Escala de crescimento de bactéria em meio de cultivo sólido: **valor 0**, ausência de UFC; (a) **valor 1**, crescimento de UFC dispersas; (b) **valor 2**, crescimento mais uniforme das UFC, ainda apresentando colônias dispersas; (c) **valor 3**, maior parte do crescimento em camada, sem distinção das UFC; (d) **valor 4**, com crescimento por toda a placa, em camada, sem distinção de UFC.

FONTE: o próprio estudo (2022).

5.3.1Ensaios de crescimento em temperatura ótima

A Figura 12 exibe os resultados para o crescimento das estirpes nas diferentes temperaturas testadas (4°C, 18°C, 30°C, 37°C, 40°C e 45°C). A faixa de crescimento ótimo variou entre 30 e 37°C, o esperado se comparado com o crescimento ótimo do gênero *Paraburkholderia* e espécies filogeneticamente próximas (PAULITSCH et al., 2019-2020; CHEN et al., 2007). Todas as estirpes apresentaram crescimento a temperatura mínima de 18°C, sendo este mais lento (até 5 dias), se comparado a 30-37°C (1 a 2 dias). *Paraburkholderia* spA, mais próxima filogeneticamente das estirpes referência testadas, teve resultados semelhantes à estas, que cresceram a 40°C (crescimento lento, até 5 dias), sendo esta a temperatura máxima de crescimento observada (*P. atlantica, P. guartelaensis* e estirpe 9.2).

FIGURA 12 - Crescimento ótimo em diferentes temperaturas¹ para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.



Temperatura ótima

¹As estirpes de bactérias foram crescidas em meio de cultivo NFb malato até D.O.₅₉₅ 1, repicadas em quadruplicata para NFb malato sólido e incubadas nas temperaturas indicadas por 48h. A escala de crescimento utilizada é detalhada na Figura 10; os grupos indicados para as estirpes foram estabelecidos na análise filogenética mostrada na Figura 7.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Paraburkholderia spD obteve crescimento ótimo em 30° C, com espectro de crescimento entre 18° C e 37° C, porém mais lento nestas temperaturas. Se comparado à literatura, *P.* tuberum, *P. sprentiae* e *P. monticola*, espécies mais próximas filogeneticamente, também apresentam crescimento máximo a 37°C, com temperatura ótima a 30°C (Anexo 8). O mesmo se repete para *Paraburkholderia* spC, com temperatura ótima de crescimento também sendo 30° C e máxima de 37° C, cujo apenas *P. dipogonis* também é descrita com crescimento a 37° C (Anexo 9).

5.3.2 Ensaios de crescimento em salinidade ótima

Para os ensaios de salinidade, houve crescimento de todas as estirpes na ausência de NaCl (0%) e crescimento de nove das 11 estirpes em 0,5% NaCl. Para as concentrações de 1 e 2% NaCl, seis e uma estirpe, respectivamente, tiveram crescimento observado (Figura 13). Não houve crescimento observado em concentrações acima de 2% NaCl. Dessa forma, a concentração de salinidade ótima

para o crescimento das estirpes é compatível com a estabelecida para o meio NFb malato, de 0,01% NaCl.

FIGURA 13 - Crescimento ótimo¹ em diferentes concentrações de NaCI para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.



Salinidade ótima

¹As estirpes de bactérias foram crescidas em meio de cultivo NFb malato até D.O.₅₉₅ 1, repicadas em quadruplicata para NFb malato sólido em diferentes concentrações de NaCl e incubadas a 30º C 48h. A escala de crescimento utilizada é detalhada na Figura 10; os grupos indicados para as estirpes foram estabelecidos na análise filogenética mostrada na Figura 7.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Paraburkholderia spA apresenta maior espectro de crescimento em maior salinidade de comparada as estirpes referência testadas, até 1% NaCl no meio. Já as estirpes testadas de *Paraburkholderia* spD obtiveram resultados divergentes, porém ambas com melhor crescimento em meios variando de 0% a 0,01% NaCl. Para as estirpes referência descritas na literatura próximas a *P.* spD, apenas *P. sprentiae* não apresentou resultados para crescimento em salinidade variada, de forma que *P. tuberum* e *P. monticola* também apresentam crescimento a 1% NaCl. *P. phytofirmans* e *P. dipogonis*, mais próximas de *Paraburkholderia* spC, também são descritas crescendo em meios com até 1% NaCl, assim como o isolado tipo testado (10.7).

Diversos estudos têm relatado a tolerância de betaproteobactérias a solos com maior salinidade, se comparado à outras comunidades de diazotróficos, de forma que a composição em relação ao sal impacta diretamente a diversidade associada às raízes e a rizosfera (ZHAO et al., 2018). Assim, os resultados obtidos são condizentes aos já observados para espécies de betaproteobactérias, já que algumas estirpes apresentaram crescimento, mesmo que baixo, para porcentagens mais latas de salinidade no meio.

5.3.3 Ensaios de crescimento em pH ótimo

Após definida a temperatura ótima de crescimento e salinidade para as estirpes, ensaios de pH ótimo foram realizados para definição das próximas variáveis de crescimento. De forma geral, a maioria das estirpes apresentaram crescimento entre pH 6 e 8 (Figura 14), e apenas a estirpe 89.3 (*Paraburkholderia* spD.) apresentou crescimento em pH 9, porém muito inferior ao seu pH ótimo, 6-7, assim como o da maioria das estirpes.

FIGURA 14 - Crescimento ótimo em diferentes pH¹ para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.



pH ótimo

¹As estirpes de bactérias foram crescidas em meio de cultivo NFb malato até D.O.₅₉₅ 1, repicadas em quadruplicata para NFb malato sólido em diferentes pHs e incubadas a 30º C 48h. A escala de crescimento utilizada é detalhada na Figura 10; os grupos indicados para as estirpes foram estabelecidos na análise filogenética mostrada na Figura 7.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Se comparadas as estirpes referência mais próximas, *Paraburkholderia* spC não apresenta dados na literatura que possam ser comparados com os resultados obtidos, de crescimento variando entre pH 6 e 8. Já para *P*. spD, dados disponíveis mostram que as espécies referência próximas apresentam crescimento em pH 8 (Anexo 8), o que

foi visto apenas para o isolado 89.3. A estirpe 88.12 obteve crescimento apenas entre pH 6 e 7. *Paraburkholderia* spA teve crescimento entre pH 6 e 8, similar as estirpes referência testadas mais próximas filogeneticamente, *P. guartelaensis* e *P. atlântica* (Anexo 7).

Num geral, as estirpes obtiveram maior crescimento em pH 6, o que reforça a capacidade já bem descrita do gênero *Paraburkholderia* de crescimento em pH mais ácido (STOPNISEK et al., 2014), se comparado aos outros gêneros nodulantes de leguminosas, como alfaproteobactérias e *Cupriavidus* sp. (MISHRA et al., 2012), de forma que o pH dos solos se mostra um importante fator no estabelecimento da diversidade de rizobactérias (LAMMEL, et al., 2018).

Visto os resultados obtidos para os ensaios de crescimento ótimo em temperatura, pH e salinidade, definiu-se que as condições ótimas para o cultivo das estirpes espécies candidatas *Paraburkholderia* spA., *Paraburkholderia* spC. e *Paraburkholderia* spD., isoladas a partir dos nódulos de *Mimosa* spp., podem ser estabelecidos a 30 °C, pH6 e 0 - 0,01% NaCl. Os resultados obtidos para as estirpes são similares aos previamente descritos para espécies próximas de *Paraburkholderia*, utilizando como referência os resultados de ANI (Tabela 7), *P. guartelaensis* e *P. nodosa* (PAULITSCH et al., 2019; CHEN et al., 2007) e os disponíveis na literatura.

5.3.4 Ensaios de crescimento em diferentes fontes de carbono

As estirpes 9.2, 6.3 e 6.1 (*Paraburkholderia* spA), 88.12 (*Paraburkholderia* spD) e 10.7 (*Paraburkholderia* spC) foram selecionadas para realização dos ensaios de crescimento em diferentes fontes de carbono, visando uma melhor caracterização da capacidade de metabolizar estas fontes para cada estirpe. A forma gráfica dos resultados são mostrados na Figura 15, e resultados tabelados podem ser encontrados no Anexo 5.

A estirpe com melhor metabolização das diferentes fontes testadas por meio do Kit GN2 foi a 9.2, estirpe tipo de *Paraburkholderia* spA, que pode ser evidenciado pelas cores mais claras no *heatmap* da Figura 15. As principais fontes de carbono metabolizadas pela estirpe ($D.O_{595} > 2,0$) foram manitol, ácido glutâmico, gentobiose, inositol, ácido glicurônico, ácido sacárico, fucose, ramnose, ácido aspártico, ácido aminobutírico, arabinose, ácido quinolínico, arabitol, adonitol, ácido glutâmico, trealose, manose, ácido glicônico, ácido galacturônico, galactose, ptolina, colebiose, asparagina e D-Glicose. Outras estirpes do filogrupo "A", porém, não apresentaram o mesmo padrão de crescimento da estirpe tipo de *P.* spA (isolados 6.3 e 6.1), com algumas fontes

de carbono não assimiladas ou com baixa assimilação em comparação ao isolado 9.2, anda que de forma geral, manitol, ácido sacárico, ramnose, ácido glicônico, ácido galacturônico, galactose e D-glucose foram mais bem assimilados.

FIGURA 15 – Crescimento em diferentes fontes de carbono¹ para estirpes para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.



Crescimento em diferentes fontes de carbono (D.O.595)

¹ O ensaio foi realizado por meio de microplacas GN2 (BioLog); a D.O.₅₉₅ foi obtida após cinco dias de incubação das microplacas a 30 °C.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Para a estirpe tipo de *Paraburkholderia* spC, isolado 10.7, o padrão de assimilação das fontes de carbono testadas foi semelhante ao encontrado para os isolados 6.1 e 6.3, porém, com algumas fontes menos assimiláveis. De maneira geral, as fontes com melhor crescimento da estirpe geraram $D.O_{595}$ entre 1 e 1,5, sendo ácido glicosamínico, sorbitol, manitol, ácido sacárico, ramnose, ácido quinolínico, ácido glicônico, ácido galacturônico, galactose e D-glucose mais bem assimilados. Já a estirpe 88.12, estirpe tipo de *Paraburkholderia* spD, teve o menor desempenho dentre todas os isolados testados no mesmo período de incubação, com o maior número de fontes não assimiladas e uma $D.O_{595}$ máxima de 0,7, baixa em relação as melhores fontes assimiladas por outras estirpes. As fontes mais bem assimiladas ($D.O_{595} > 0,5$) foram ácido lactona galacturônico, ácido pirúvico metil éster, acetil glicosamina, ácido glicosamínico e tween 40.

Em princípio, porém, todas as estirpes seguiram um padrão de crescimento, com as áreas mais escuras no *heatmap* (menor D.O₅₉₅ e consequente menor crescimento) se igualando para praticamente todos os rizóbios testados. A maioria dos genes responsáveis pela metabolização de compostos carbônicos são encontrados em ilhas genômicas móveis ou em plasmídeos e, dessa forma, a capacidade de assimilação de diversas moléculas pode ser adquirida por meio de transferências horizontais gênicas (SUVOROVA e GELFAND, 2019). A identificação de um padrão de metabolização de diversos compostos também pode ser útil taxonomicamente, visando a taxonomia polifásica, para caracterizar bioquímica e fenotipicamente os isolados, auxiliando no estabelecimento de novas espécies de rizóbios.

5.3.5 Ensaios de resistência à antibióticos

Pelo menos uma estirpe de cada provável nova espécie (*Paraburkholderia* spA, spC e spD) foi selecionada para definir a resistência a antibióticos em diferentes concentrações (Tabela 1), assim como estirpes tipo mais próximas filogeneticamente de acordo com análises genômicas e filogenéticas. Os resultados estão ilustrados na Figura 16. De maneira geral, a maioria das estirpes apresentaram resistência à Ampicilina (Amp) e Gentamicina (Gn), de forma que o isolado com mais amplo espectro de resistência foi a estirpe 10.7, apenas sensível à Canamicina (Km) e Tetraciclina (Tc).

FIGURA 16 – Crescimento ótimo em diferentes antibióticos para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.





¹As estirpes de bactérias foram crescidas em meio de cultivo NFb malato até D.O.₅₉₅ 1, repicadas em quadruplicata para NFb malato sólido com diferentes antibióticos e incubadas a 30° C 48h. A escala de crescimento utilizada é detalhada na Figura 10; os grupos indicados para as estirpes foram estabelecidos na análise filogenética mostrada na Figura 7. Concentração final dos antibióticos: Ampicilina (Amp) 0,25 μg/mL; Gentamicina (Gn) 0,025 μg/mL; Canamicina (Km) 0,10 μg/mL; Cloranfenicol (Cn) 0,03 μg/mL; Tetraciclina (Tc) 0,01 μg/mL; Estreptomicina (Sm) 0,08 μg/mL.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Diversos estudos relatam a resistência de betaproteobactérias a diversos antibióticos, principalmente aquelas relacionadas a questões sanitárias e de saúde humana (VAZ-MOREIRA et al., 2014), de forma que muitas espécies carregam em seus genomas genes de virulência, que podem conferir a todo o gênero uma maior capacidade de contornar a ação dos antimicrobianos (FERRO et al., 2019).

De maneira geral, porém, a caracterização de resistência a estas moléculas para bactérias diazotróficas simbióticas tem maior efeito no aperfeiçoamento do isolamento e manutenção de culturas, no que tange a evitar contaminações e criar um meio seletivo de crescimento para estes rizóbios.

5.3.6 Caracterização de Ácidos Graxos

Análises de perfil lipídico foram realizadas por derivados metil-ester de ácidos graxos (FAME, do inglês, *fatty acid methyl ester*) e a porcentagem relativa de ácidos graxos de cada estirpe testada estão demonstrados abaixo (Tabela 9).

TABELA 9 – Perfil lipídico¹ de estirpes² isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. no Paraná e estirpes referência de *Paraburkholderia guartelaensis*.

Ácido Graxo	1	2	3	4	5	6
C14:0	2,5	2,6	2,0	2,2	2,4	3,1
C16:0	41,2	39,3	31,1	34,0	35,2	38,9
C17:0	18,0	18,6	3,5	2,3	12,6	13,9
C18:2	3,7	3,4	0,6	0,4	2,0	1,9
C18:0	4,3	9,7	14,6	8,4	3,5	3,2
C20:1	5,1	5,1	2,4	0,3	0,6	0,6
C19:0	14,3	12,2	23,6	26,7	24,0	20,6
C24:1	5,6	5,2	10,9	11,3	10,3	9,1

¹Os valores são apresentados como porcentagem do total de cada perfil de ácidos graxos; ²*Paraburkholderia guartelaensis* CNPSo 3008^T (1); estirpe 88.12 (2); estirpe 10.7 (3); estirpe 9.2 (4); estirpe 6.1 (5); estirpe 6.3 (6).

FONTE: o próprio estudo (2022).

O padrão de perfil lipídico é similar entre as estirpes representantes de *Paraburkholderia* spA, com maior porcentagem relativa de ácidos graxos sendo C16:0, C19:0 e C24:1. Há uma pequena diferença, porém, em relação a C17:0, que tem porcentagem maior nas estirpes 6.1 e 6.3, em relação à 9.2. Em comparação com a estirpe referência mais próxima, *Paraburkholderia guartelaensis*, o perfil lipídico se mantém semelhante, com os mesmos ácidos graxos em maior percentual relativo. O mesmo pode ser visto para a estirpe 88.12, isolado tipo de *Paraburkholderia* spD,

mantendo C16:0, C17:0 e C19:0 a valores muitos próximos de *P. guartelaensis*, por mais que esta não seja a espécie mais próxima genética e filogeneticamente ao isolado.

Na literatura, *P. tuberum* ST678^T, *P. sprentiae* WS5005^T e *P. monticola* JC 2948^T, estirpes referência mais próximas de *Paraburkholderia* spD, apresentam o perfil lipídico similar aos vistos para o isolado 88.12, com C16:0, C17:0 e C19:0 em maiores porcentagens (Anexo 8). Já para o isolado 10.7, estirpe tipo de *Paraburkholderia* spC, o perfil lipídico diferiu significativamente das outras estirpes testadas, com C16:0, C18:0, C19:0 e C24:1 em maior percentual relativo. Se comparado a *P. dipogonis* e *P. phytofirmans*, representantes mais próximos genética e filogeneticamente, não há semelhança entre os perfis, visto que as distribuições de ácidos graxos se mostram diferentes (Anexo 9), e, dessa forma, uma composição diferente de ácidos graxos pode ser notada entre *Paraburkholderia* spC e suas estirpes referência próximas.

5.3.7 Ensaios de Motilidade

A motilidade pode se alterar de acordo com a consistência do meio onde a bactéria se encontra e a movimentação do flagelo, podendo variar entre *swarming* ou *swimming*, de forma que betaproteobactérias apresentam apenas este último tipo de motilidade, em meios com menos de 0,3% ágar (KEARNS, D.B., 2010). Para estes ensaios, estirpes dos filogrupos "A", "C" e "D" foram testadas para avaliar sua capacidade de motilidade tipo *swimming* (Figura 17).

Durante os ensaios, os resultados foram avaliados pela formação ou não de halo a partir o ponto de inoculação das estirpes na placa após 72 horas de incubação a 28º C.

FIGURA 17 – Ensaios de motilidade em NFB malato 0,25% ágar para estirpes selecionadas por meio de análises filogenéticas, isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.



¹As estirpes de bactérias foram crescidas em meio de cultivo NFb malato até D.O.₅₉₅ 1, repicadas em triplicata para NFb malato semissólido 0,25 ágar, e incubadas a 30° C 48h. A escala de crescimento utilizada é analisa pela formação ou não de halo, de forma que a presente deste indica sinais de motilidade tipo swimming e presença de flagelo.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Hendrixson e colaboradores (2001) identificaram diversos genes necessários à motilidade e propuseram rotas metabólicas envolvidas na motilidade para as bactérias. Ao analisar os genomas dos isolados testados a procura de genes relacionados com a motilidade, como genes estruturais flagelares, viu-se que as estirpes 9.2, 88.12 e 10.7, estirpes tipo de *Paraburkholderia* spA, spD e spC, respectivamente, apresentam os principais genes responsáveis pela presença de estrutura flagelar. Os genomas foram analisados utilizando a plataforma RAST (<u>https://rast.nmpdr.org/</u>) (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014; BRETTIN et al., 2015), apontando mais de 20 genes relacionados a motilidade flagelar nas três espécies (Anexo 6).

A formação de halo, porém, ocorreu apenas para a estirpe 10.7, estirpe tipo de *Paraburkholderia* spC, indicando a presença de motilidade tipo *swimming* para esta estirpe. Ensaios de microscopia para confirmação da presença de flagelo nesta e nas outras estirpes devem ser realizadas para maior suporte aos resultados, visto que embora tenha sido possível detectar os genes ligados à motilidade, não se observou formação de halo no ensaio.

5.4 ENSAIOS DE INTERAÇÕES PLANTA-BACTÉRIA

5.4.1 Ensaios de nodulação

Estripes dos agrupamentos *clstr0001*, *clstr0003*, *clstr0006*, *clstr0010* e *clstr0013*, correspondentes aos filogrupos "D", "A" e "C", respectivamente, foram testados para avaliar sua capacidade de nodular a leguminosa *Mimosa pudica*, já amplamente utilizada para ensaios de nodulação e captação de rizóbios no solo (MISHRA et al., 2012). Após o período de avalição, todos os isolados demonstraram capacidade de induzir a formação de nódulos na planta (Tabela 10; Figura 18).

TABELA 10 – Ensaios de nodulação em *Mimosa pudica* de estirpes isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

Estirpe	Grupo (CD-HIT)	Grupo (filogenia)	Peso	DP	Número	DP NN ²	Peso	DP PN ³	Presença de genes	
			(g) <i>M</i> .	peso	de		dos		fixadores/	nodulantes
			pudica	(g) ¹	nódulos		nódulos		nifH	nodC
BN5.2	clstr0001	D	4.19	1.32	442	203.7	0.276	0.175	SIM	SIM
RP2.3.1	clstr0001	D	0.19	0.03	91	25.2	0.066	0.015	SIM	SIM
11.13	clstr0003	А	0.06	0.01	83	25.4	0.019	0.012	SIM	SIM
6.1	clstr0003	А	0.40	0.07	130	40.9	0.069	0.063	SIM	SIM
9.2	clstr0006	А	0.11	0.02	27	5.0	0.032	0.008	SIM	SIM
7.1	clstr0006	А	0.10	0.05	67	18.3	0.055	0.034	SIM	SIM
6.3	clstr0010	А	0.10	0.03	16	6.75	0.029	0.040	SIM	SIM
10.7	clstr0013	С	0.035	0.004	18	4.57	0.088	0.002	SIM	SIM
Controle positivo	Cupriavidus taiwanensis LMG19424	-	4.1	0.88	213	106.1	0.099	0.047	SIM	SIM
Controle negativo	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-

¹Desvio padrão (DP) para o peso de *M. pudica* para cada estirpe testada; ²Desvio padrão (DP) para o número de nódulos (NN) para cada estirpe testada; ³Desvio padrão (DP) para o peso dos nódulos (PN) para cada estirpe testada.

FONTE: o próprio estudo (2022).

Os resultados positivos confirmam a capacidade destas estirpes de nodular *Mimosa pudica* e os genes envolvidos na indução da formação de nódulos também foi amplificado e sequenciado (*nodC*) para cada estirpe (Figura 9). Os resultados também demostraram uma promoção do crescimento vegetal das plantas inoculadas se comparadas ao controle negativo (Tabela 10 em "Peso (g) *M. pudica*"; Figura 18), que pode ter sido resultando da maior disponibilidade de nitrogênio para planta por meio da fixação biológica do mesmo pelas estirpes, sendo esta também confirmada pela amplificação e sequenciamento do gene *nifH* (Figura 8).

FIGURA 18 – Promoção do crescimento vegetal em ensaio de nodulação em plantas de *M. pudica* inoculadas com as estirpes¹ isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.



¹Estirpes representantes de *Paraburkholderia* spD (a), *Paraburkholderia* spA (b) e *Paraburkholderia* spC (c), indicando formação de nódulos nas raízes e crescimento apical para cada planta de *M. pudica*, assim como o controle positivo *C. taiwanensis* LMG19424 (e), e o controle negativo (d), sem formação de nódulos.

FONTE: o próprio estudo (2022).

No mesmo norte, ao analisar os dados da inoculação em *M. pudica* para a estirpe BN5.2 (*Paraburkholderia* spD) para as variáveis "Peso (g) *M. pudica*" e "Número de nódulos" (Tabela 9), vê-se resultados melhores, se comparados às outras estirpes testadas. A Figura 17a também ilustra o maior crescimento da planta inoculada com a estirpe, com crescimento da parte aérea de 24 cm, enquanto plantas de *M. pudica*"

inoculadas com outros isolados crescerem de 4 a 6 centímetros (Figura 17b; 17c). Estes resultados podem indicar uma possível promoção de crescimento vegetal induzido por este rizóbios, e mais estudos devem ser feitos para a confirmação ou não desta hipótese.

5.5 DESCRIÇÃO DAS NOVAS ESPÉCIES PROPOSTAS PARA O GÊNERO Paraburkholderia

A partir dos resultados demonstrados neste trabalho, proem-se a criação de três novas espécies para o gênero *Paraburkholderia*, ainda sem sugestão de nomes, contendo grupos de isolados nativos no Sul do Brasil, capazes de induzir a formação de nódulos em *Mimosa* spp. Abaixo são descritas as características morfológicas, microbiológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas avaliadas, que caracterizam cada uma das espécies.

5.5.1 Descrição de *Paraburkholderia* sp*A*. nov.

Para descrição desta nova espécie, foi utilizada como estirpe tipo a estirpe 9.2 referente ao grupo *clstr0006*, isolada de nódulos de *Mimosa* murex, Quiriri, estado de Santa Catarina – Brasil (latitude 26°1'46.36"S; longitude 48°57'33.62"W, altitude 1538 m). Colônias em YMA são brancas, opacas e circulares, com baixa produção de muco, quando incubadas a 28 °C por 48h. Crescimento ótimo ocorre entre pH 6-6,8 e 28-30 °C, 0,01% NaCl. A estirpe são capaz de crescer em meio NFb malato entre pH 6 e 8, 1% NaCl e entre 18 e 40 °C.

Em testes de crescimento em diferentes fontes de carbono, houve melhor assimilação de manitol, ácido glutâmico, gentobiose, inositol, ácido glicurônico, ácido sacárico, fucose, ramnose, ácido aspártico, ácido aminobutírico, arabinose, ácido quinolínico, arabitol, adonitol, ácido glutâmico, trealose, manose, ácido glicônico, ácido galacturônico, galactose, ptolina, colebiose, asparagina e D-Glicose. Não houve assimilação de água, ciclodextrina, dextrina, eritritol, maltose, melibiose, rafinose, sucrose, xilitol, ácido cetovalérico, timidina, turanose, serina, β -metil glucosidase, inosina, Glicose 1-fosfato, uridina, 2,3-Butanediol, ácido hidroxibutirico, α -D-lactose e carnitina (Anexo 5).

A estirpe é sensível a Tetraciclina (0,01 μg), Ampicilina (0,25 μg), Cloranfenicol (0,03 μg), Gentamicina (0,025 μg), Estreptomicina (0,08 μg) e Canamicina (0,1 μg). Não

foi possível observar a presença de motilidade tipo *swimming* em testes com NFb malato 0,25% ágar, ainda que os genes responsáveis pela motilidade flagelar tenham sido detectados no genoma (Anexo 6).

Os ácidos graxos em maior quantidade relativa são $C_{16:0}$, $C_{17:0} e C_{19:0}$. O conteúdo G + C no DNA da estirpe é de 63,4 mol%, com tamanho de 9,1 Mb, estimados a partir da sequência genômica. As estirpes são capazes de fixar nitrogênio e induzir a formação de nódulos em *Mimosa pudica* em casa de vegetação. Tem como espécies mais próximas filogeneticamente *P. nodosa*, *P. guartelaensis* e *P. silvatlantica* (Anexo 7).

5.5.2 Descrição de *Paraburkholderia* spD. nov.

Para descrição desta nova espécie, foi utilizada como estirpe tipo a estirpe 88.12 referente ao grupo *clstr0001*, isolada de nódulos de *Mimosa daleoides*, Recanto dos Papagaios, estado do Paraná – Brasil. A espécie também tem estirpes encontradas nodulando *M. dolens, M.* pilulifera, *M. dryandroides* e *M. furfuraceae*. Colônias em YMA são brancas, opacas e circulares, com baixa produção de muco, quando incubadas a 28 °C por 48h. Crescimento ótimo ocorre entre pH 6-6,8 e 28-30 °C, 0,01% NaCl. As estirpes são capazes de crescer em meio NFb malato entre pH 6 e 7, 0,5% NaCl e entre 18 e 37 °C.

Em testes de crescimento em diferentes fontes de carbono, as fontes mais bem assimiladas (D.O₅₉₅ > 0,5) foram ácido lactona galacturônico, ácido pirúvico metil éster, acetil glicosamina, ácido glicosamínico e tween 40. Não são assimilados água, ciclodextrina, eritritol, maltose, melibiose, rafinose, sucrose, xilitol, ácido cetovalérico, timidina, turanose, serina, β -metil glucosidase, inosina, Glicose 1-fosfato, uridina, 2,3-Butanediol, ácido hidroxibutirico, α -D-lactose, carnitina, ácido cetobutirico, feniletilamina, D-psicose, glicerol fosfato, ácido fórmico, ácido acético, lactulose, glicose-6-fosfato, alaninamida, ácido propiônico, ácido málico, ácido bromosuccínico, putrescina, ornitina, alanil-glicina, serina, entre outros (Anexo 5).

As estirpes são resistentes a Ampicilina (0,25 μ g) e Gentamicina (0,025 μ g), e sensíveis a Tetraciclina (0,01 μ g), Cloranfenicol (0,03 μ g), Estreptomicina (0,08 μ g) e Canamicina (0,1 μ g). Não foi possível observar a presença de motilidade tipo *swimming* em testes com NFb malato 0,25% ágar, ainda que os genes responsáveis pela motilidade flagelar tenham sido detectados no genoma (Anexo 6).
Os ácidos graxos em maior quantidade são $C_{16:0}$, $C_{17:0} e C_{19:0}$. O conteúdo G + C no DNA da estirpe é de 64,04 mol%, com tamanho de 7 Mb. As estirpes são capazes de fixar nitrogênio e induzir a formação de nódulos em *Mimosa pudica* em casa de vegetação. Tem como principais espécies relacionadas filogeneticamente *P. tuberum*, *P. sprentiae* e *P. monticola* (Anexo 8).

5.5.3Descrição de Paraburkholderia spC. nov.

Para descrição desta nova espécie, foi utilizada como estirpe tipo a estirpe 10.7 referente ao grupo *clstr0013*, isolada de nódulos de *Mimosa piscatorum*, Quiriri, estado de Santa Catarina – Brasil (latitude 26°1'46.36"S; longitude 48°57'33.62"W, altitude 1538 m). Colônias em YMA são brancas, brilhantes e circulares, com alta produção de muco, quando incubadas a 28 °C por 48h. Quando inoculada em meio NFb malato sólido, a produção de muco sessa. Crescimento ótimo ocorre entre pH 6-6,8 e 28-30 °C, 0,01% NaCl. As estirpes são capazes de crescer em meio NFb malato entre pH 6 e 7, 1% NaCl e entre 18 e 37 °C.

Em testes de crescimento em diferentes fontes de carbono, houve melhor assimilação (D.O₅₉₅ > 1,0) glicosamínico, sorbitol, manitol, ácido sacárico, ramnose, ácido quinolínico, ácido glicônico, ácido galacturônico, galactose e D-glucose. Não houve assimilação de água, ciclodextrina, eritritol, maltose, melibiose, rafinose, sucrose, xilitol, ácido cetovalérico, timidina, turanose, β -metil glucosidase, Glicose 1-fosfato, uridina, 2,3-Butanediol, ácido hidroxibutirico, α -D-lactose, carnitina, feniletilamina, glicogênio, glicerol fosfato, lactulose, ácido itacônico, glicose-6-fosfato, putrescina, alanil-glicina, ácido α -cetoglutâmico, entre outros (Anexo 5).

As estirpes são resistentes a Ampicilina (0,25 μ g), Gentamicina (0,025 μ g), Estreptomicina (0,08 μ g) e Cloranfenicol (0,03 μ g), e sensíveis a Tetraciclina (0,01 μ g) e Canamicina (0,1 μ g). Durante ensaios de motilidade, foi possível observar formação de halo pelo crescimento das estirpes quando inoculadas em NFb malato 0,25% ágar, indicando presença de flagelo e motilidade tipo *swimming*, sendo os genes responsáveis pela motilidade detectados no genoma (Anexo 6).

Os ácidos graxos em maior quantidade são $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ e $C_{19:0}$. O conteúdo G + C no DNA da estirpe é de 61,9 mol%, com tamanho de 8,8 Mb. As estirpes são capazes de fixar nitrogênio e induzir a formação de nódulos em *Mimosa pudica* em casa de vegetação. Tem como principais espécies relacionadas filogeneticamente *P. phytofirmans* e *P. dipogonis* (Anexo 9).

6 CONCLUSÃO

A caracterização da diversidade existente de rizobactérias é essencial para que se possa entender a evolução das interações entre planta-bactéria e as especificidades de cada hospedeiro e simbionte. A descrição de novas espécies de rizóbios se encaixa como um dos principais fatores no aumento do conhecimento da biodiversidade de microrganismos diazotróficos e na história evolutiva de vários gêneros de simbiontes, como as betaproteobactérias.

Ao caracterizar a biodiversidade de microrganismos nodulantes de leguminosas endêmicas do gênero *Mimosa* nos estados sul brasileiros, 14 diferentes locais de coleta foram amostrados entre os estados do Paraná e Santa Catarina, totalizando 20 diferentes espécies de *Mimosa*. Destas, foram obtidos mais de 180 isolados por meio da maceração de nódulos, e por meio de análises com o gene *16S rRNA*, a maioria foi identificada como bactérias fixadores de nitrogênio pertences as alfa e betaproteobactérias, dos gêneros *Cupriavidus, Burkholderia, Paraburkholderia, Herbaspirillum, Rhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium* e *Ensifer* sp. As poucas estirpes que não puderam ser identificadas por meio de bancos de dados foram posicionadas como possíveis novas espécies dentro dos gêneros *Cupriavidus* e *Paraburkholderia*.

Análises filogenéticas dos isolados de *Paraburkholderia* sp. sugeriram três filogrupos, estabelecidos como filogrupo "A", "C" e "D" dentro do gênero, sendo possivelmente três novas espécies de betarizóbios, *Paraburkholderia* spA, *Paraburkholderia* spC e *Paraburkholderia* spD. Através de análises genômicas, bioquímicas e fenotípicas, estas puderam ser identificadas e suas características são descritas neste trabalho. *Paraburkholderia* spA sp. nov. é uma bactéria fixadora de nitrogênio capaz de induzir a formação de nódulos de leguminosas do gênero *Mimosa*, sendo encontrada como microrganismo simbionte em espécies endêmicas no sul do Brasil, em altitudes elevadas.

Paraburkholderia spD sp. nov. é uma bactéria diazotrófica capaz de induzir a formação de nódulos em *Mimosa* spp., sendo encontrada em simbiose com diversas espécies de *Mimosa* endêmicas no planalto norte do estado do Paraná, Brasil. Já *Paraburkholderia* spC sp. nov. é uma diazotrófica nodulante encontrada unicamente em *Mimosa piscatorum*, sendo possivelmente simbionte específica desta leguminosa, amostrada no Quiriri em elevadas altitudes, em Santa Catarina, no Sul brasileiro.

7 **BIBLIOGRAFIA**

ABDEL-LATEIF, K.; BOGUSZ, D.; HOCHER, V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbiosis with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, p. 636-641. 2012.

ALMEIDA, I.M.G. et al. Mancha bacteriana em *Ruscus* sp. causada por *Burkholderia andropogonis* no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, 2009.

ANDREWS, M.; ANDREWS, M.E. Specificity in legume-rhizobia symbiosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 705. 2017.

AOKI, S.; ITO, M.; IWASAKI, W. From β- to α-Proteobacteria: the origin and evolution of rhizobial nodulation gene *nodlJ*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 11, p. 2494-2508. 2013.

AUCH, A. F.; KLENK, H.; GOKER, M. Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. **Standards in Genomic Science**, v. 2, n. 1, p. 142-148. 2010a.

AUCH, A. F.; JAN, M.; KLENK, H.; GOKER, M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in Genomic Science**, v. 2, n. 1, p. 117-134. 2010b.

AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**. 2008.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477. 2012.

BASU, S.; KUMAR, G. Nitrogen fixation in a legume-rhizobium symbiosis: the role of a success story. *In:* VARMA, A.; et al. **Plant Microbe Symbiosis**, Springer Nature, 2020. p. 35-49.

BEAK, I.; SEO, B.; LEE, I.; et al. *Burkholderia monticola* sp. nov., isolated from mountain soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 504-509. 2015.

BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; et al. GenBank. Nucleic Acid Research, v. 41, pg. 36-42. 2013.

BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. British Microbiology Research Journal, v. 4, n. 6, pg. 616-639. 2014.

BONTEMPS, C.; ELLIOT, G.; SIMON, M.F.; et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v.19, n.1, p. 44-52. 2010.

BONTEMPS, C. et al. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist**, v. 209 p. 319–333, 2016.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120. 2014.

BOURNAUD, C.; FARIA, S.M., DOS SANTOS, J.M.; et al. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae). **PLoS One**, v. 8, n. 5. 2013.

BOURNAUD, C. et al. *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.

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. **Sci Rep**. 2015.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathol**., v. 40, p. 115–117, 1950.

CARVALHO, N. L.; ZABOT, V. Nitrogênio: nutriente ou poluente? **Rev. Elet. em Gestão**, **Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 960 – 974, 2012.

CHEN, W-M.; WU, C-H.; JAMES, E.K.; et al. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. Journal of Hazardous Materials, v. 151, n. 2–3, p. 364-371. 2008.

CHEN, W-M.; FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; et al. Burkholderia nodosa sp. Nov, isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5. 2007.

CHEN, W-M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa sp.* from Taiwan and South America. **International Journal** of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 56, n. 8. 2006.

CHEN, W. M. et al. β-Rhizobia from Mimosa pigra, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v. 168, p. 661–675, 2005.

CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; et al. Proposed minimal standards for the uso of genome data for the taxonomy of prokaryiotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 461-466. 2018.

CHEN, W. M. et al. Legume Symbiotic Nitrogen by β-Proteobacteria is widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266–7272, 2003.

COUTINHO, A.P.S. Revisão taxonômica e estudos filogenéticos de *Mimosa* L. sect. *Calothamnos* Barneby Leguminosae – Mimosoideae). 311 f. **Tese (Doutorado em Ciências – Botânica)** – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

COX, M.M. Regulation of Bacterial RecA Protein Function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p.41–63. 2007. DALL'AGNOL, R.F.; BOURNAUD, C.; FARIA, S.M., et al. 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.; et al. *Burkholderia sprentiae* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3950-3957. 2013.

DE MEYER, S.E.; BRISCOE, L.; MARTINEZ-HIDALGO, P. Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high-affinity cytochrome *cbb3* oxidase genes. **MPMI**, v. 29, n. 8, p. 609-619. 2016.

diCENZO, G.G.; FINAN, T.M. The divided bacterial genome: Structure, function, and evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 2017.

ELLIOTT, G.N.; CHOU, J-H.; CHEN, W-M.; et al. *Burkholderia* sp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 762–778. 2009.

ERISMAN, J.W.; GALLOWAY, J.; SEITZINGER, S.; Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. **Current opinion in Environmental sustainability**, v. 3, n. 5, p. 281-290. 2011.

FAGAN, E.B. et al. Fisiology of biologic fixation nitrogen in soybean – a review. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 89-106. 2007.

FELSENSTEIN, Joseph. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, v. 39, n. 4, p. 783-791. 1985.

FERNANDES, M.F.; CHAER, G.M. Análise de Perfis de Ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia de solo. **Empraba**, 2010.

FERRO, P.; VAZ-MOREIRA, I.; MANAIA, C.M.; *Betaproteobacteria* are predominant in drinking water: are there reasons for concern? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, p. 649-667. 2019.

FIELDS, B.; MOFFAT, E.K.; FRIMAN, V.; et al. The impact of intra-specific diversity in the rhizobia-legume symbiosis. **Microbiology**, v. 167, n. 4. 2021.

FRAZÃO, J.J.; SILVA, A.R.; SILVA, V.L. Enhanced efficiency nitrogen fertilizers and urea in corn. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, v. 18, n. 12, 2014.

FRANCO, L. M. G.; GUTIERRE, M.A.M.; SOUZA, L.A.; et al. Identificação de espécies do gênero *Mimosa* L. (Fabaceae – Mimosoideae), através da morfologia de tricomas do ramo e do eixo da inflorescência. **XI EPCC**, Anais Eletrônicos. 2019.

FU, L.; NIU, B.; ZHU, Z.; et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 23, p. 3150-3152. 2012.

GALLO, L.A. Metabolismo do Nitrogênio: Ciclo do Nitrogênio. ESALQ, 2013.

GARRITO-OTER, R.; NAKANO, R.T.; DOMBROWSKI, N.; et al. Modular traits of the Rhizobiales root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 1, p. 155-167. 2018.

GONZALEZ, V.; SANTAMARIA, R.I.; BUSTOS, P.; et al. Phylogenomic *Rhizobium* species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters. **Frontiers in Microbiology**. 2019.

GRAHAM, P.H.; SADOWSKY, M.J.; KEYSER, H.H.; et al. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 4. 1991

GROFFMAN, P.M.; ROSI, E.J.; FULWEILER, R.W. The Nitrogen Cycle. *In:* WEATHERS, K.C.; et al. **Fundamentals of Ecosystem Science**, Academic Press, 2021, p. 161-188.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075. 2013.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98. 1999.

HASKETT, T.L; KNIGHTS, H.E.; JORRIN, B.; et al. A simple *in situ* assay to assess plantassociative bacterial nitrogenase activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

HASSAN, S.; MATHESIUS, U. Flavonoids play multiple roles in symbiotic rootrhizosphere interactions. *In*: BRUJIN, F.J. **Biological Nitrogen Fixation**, 2015.

HENDRIXSON, D.R.; AKERLEY, B.J.; DiRITA, V.J. Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1., p. 214-224. 2001.

HOFFMAN, B.M. et al. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. **Chem. Rev.** V.114, p. 4041-4062, 2014.

JAIN, C.; RODRIGUEZ-R, L.M.; PHILIPPY, A.M.; et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. **Nature Communications**, v. 9, p. 5114. 2018.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In **Munro HN**, editor, Mammalian Protein Metabolism, pp. 21-132, Academic Press, New York. 1969.

KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; GANESHAMURTHY, A.N. *Burkholderia* to *Paraburkholderia*: The Journey of a Plant-Beneficial-Environmental Bacterium. In: Shukla, P. **Recent Advances in Applied Microbiology**. Springer, Singapore, cap. 10. 2017.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634–644, 2010.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. **Can J Microbiol.**, v.43, p.841-846. 1997.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874. 2016.

KUSS, A.V. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. 2006. **Tese (Doutorado em Ciências de Solo)** – Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, Santa Maria.

LAJUDIE, P.M.; ANDREWS, M.; ARDLEY, J.; et al. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematics and Evolutionary Mirobiology**, v. 69, n. 7. 2019.

LAMMEL, D.R.; BARTH, G.; OVASKAINEN, O. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. **Microbiome**, n. 106. 2018.

LARKIN, M.A.; BLASKSHELDS, G.; BROWN, N.P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948. 2007.

LERY, L.M.; BITAR, M.; COSTA, M.G.; et al. Unraveling the molecular mechanisms of nitrogenase conformational protection against oxygen in diazotrophic bacteria. **BMC Genomics**, v. 11, n. 7, 2010.

LIRA, M.A.; NASCIMENTO, L.R.S; FRACETTO, G.G.M. Legume-rhizobia signal Exchange: promiscuity and environmental effects. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 945. 2015.

LIU, X. et al. Phylogenetic relationships and diversity of β-rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 61, p. 334–342, 2011.

LIU, X. et al. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China. **FEMS Microbiol. Ecol**., v. 80, p. 417–42, 2012.

LIU, W.Y.Y.; RIDGWAY, H.J.; JAMES, T.K.; et al. *Burkholderia* sp. induces functional nodules on the South african invasive legume *Dipogon lignosus* (Phaseoleae) in New Zealand soils. **Microb Ecol**. 2014.

LUSETTI, S.L.; COX, M.M. The Bacterial Recaprotein and The Recombinational Dna Repair of Stalled Replication **Fork. Annu. Rev. Biochem**, v. 71, p. 71–100, 2002.

MACHADO. P.F.S. Contribuição da anatomia do lenho à taxonomia do gênero *Mimosa* L., com base em espécies do sul do Brasil. 2020. **Tese (Doutor em Engenharia Florestal) –** Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T.A.; GOLDBERG, J.B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature**, v. 3, p. 144, 2005.

MANNAA, M.; PARK, I.; SEO, Y. Genomic Features and Insights into the taxonomy, virulence, and benevolence of plant-associated *Burkholderia* species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1. 2019.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H.; et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 60. 2013.

MISHRA, R.P. et al. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS Microbiol Ecol.,** v. 79, n. 2, p. 487-503, 2012.

MOREIRA, F.S. Diversidade e Análise de bactérias nodulantes de *Mimosa* sp. no estado do Paraná e Santa Catarina. 2018. **Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)** - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MOSCATIELLO, R.; SQUARTINI, A.; MARIANI, P.; et al. Flavonoid-induced calcium signaling in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 814-823. 2010.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948–950, 2001.

MOULIN, L.; JAMES, E.K.; KLONOWSKA, A.; et al. Phylogeny, Diversity, Geographical Distribution, and Host Range of Legume-Nodulating Betaproteobacteria: What Is the Role of Plant Taxonomy? **Biological Nitrogen Fixation**, Volume 1, First Edition. 2015.

MURRAY, C.S.; GAO, Y.; WU, M. Re-evaluating the evidence for a universal genetic boundary among microbial species. **Nature Communications**, v. 12, p. 4059. 2021.

MUS, F.; CROOK, M.B.; GARCIA, K.; et al. Symbiotic Nitrogen Fixation and Challenges to Extending it to non-Legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, 2016.

MUS, F.; COLMAN, D.R.; PETERS, J.W.; et al. Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 140, n. 20, p. 250-259. 2019.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858. 2000.

MYROLD, D.D. Transformation of nitrogen. *In:* GENTRY, T.J.; et al. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. Elsevier, 2021, p. 385-421.

NAVEED, M.; QURESHI, M.A.; ZAHIR, Z.A.; et al. L-tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Ann Microbiol**, v. 65, p. 1381-1389. 2018.

NELSON, M.S.; SADOWSKY, M.J. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 491. 2015.

OLDROYD, G.E.; LONG, S.R. Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of Medicago truncatula involved in Nod factor signaling. **Plant Physiol**., v. 131, p. 1027–1032, 2003.

OVERBEEK, R.; OSLON, R.; PUSCH, G.D.; et al. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). **Nucleic Acids Rev.** 2014.

PALMER, M.; STEENKAMP, E.T.; BLOM, J.; et al. All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2937-2948. 2020.

PARKS, D.H.; CHUVOCHINA, M.; WAITE, D.W.; et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology**, v. 36, p. 996-1004. 2018.

PARTE, A.C. LPSN – List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 68, n. 1. 2018.

PARTE, A.C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 5607-5612. 2020.

PAULITSCH, F.; DALL'AGNOL, R. F.; DELAMUTA, J.R.; et al. *Paraburkholderia guartelaensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from nodules of *Mimosa gymnas* in an ecotone considered as a hotspot of biodiversity in Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 201, pg. 1435-1446. 2019.

PAULITSCH, F.; DALL'AGNOL, R. F.; DELAMUTA, J.R.; et al. *Paraburkholderia atlantica* sp. nov. and *Paraburkholderia franconis* sp. nov., two new nitrogen-fixing nodulating species isolated from Atlantic Forest soils in Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1369-1380. 2020.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VELDEZ, G.; et al. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maze. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1931-1937. 2006.

PINDI, P.K.; SATYANARAYANA, S.D.V.; KUMAR, K.S. Rhizobium-Legume symbiosis: Molecular determinants and Geospecificity. **J. Pure Appl Microbiol**., v. 14, n. 2, p. 1107-1114. 2020.

PIRES, R.C. et al. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. **Plant Soil,** v. 423, p. 411-428, 2018.

PLATERO, R. et al. Novel *Cupriavidus* Strains Isolated from Root Nodules of Native Uruguayan *Mimosa* Species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n. 11, p. 3150-3164, 2016.

PRATAMA, A.A.; ELSAS, J.D. A novel inducible prophage from the mycosphere inhabitant *Paraburkholderia terrae* BS43. **Scientifics Reports**, v. 7, 2017.

RAHIMLOU, S.; BAHRAM, M.; TEDERSOO, L. Phylogenomics reveals the evolution of root nodulating alpha- and beta-Proteobacteria (rhizobia). **Microbiological Research**, v. 250. 2021.

RAMIREZ-BAHENA, M.H.; PEIX, A.; RIVAS, R.; et al. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1929-1934. 2009.

RAMIREZ, M.D.A.; ESPANA, M.; AGUIRRE, C.; et al. *Burkholderia* and *Paraburkholderia* are predominant soybean rhizobial genera in Venezuelan soils in different climatic and topographical regions. **Microbes Environmental**. 2018.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. Fixação Biológica do Nitrogênio – Estado da Arte. *In:* AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo- planta: ferramentas para uma agricultura sustentável.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, cap. 6, 2006.

REIS, F. B. 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.

REMIGI, P. et al. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 63-75, 2016.

REN, B.; WANG, X.; MA, J. Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. **Science**, v. 365, n. 6456, p. 919-922. 2019.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **PNAS**, v. 106, p. 19126–19131. 2009.

83

ROCHE, P. et al. The common nodABC genes of Rhizobium meliloti are host-range determinants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 15305–15310, 1996.

RODERJAN, C.V.; GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y.S.; et al. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, Brasil. **Ciência e Ambiente,** v. 24, n. 1, p. 75-92. 2002.

RODRIGUEZ-R, L.M.; JAIN, C.; CONRAD, R.E.; et al. Reply to: "Re-evaluating the evidence for a universal genetic boundary among microbial species. **Nature Communications**, v. 12, p. 4060. 2021.

ROY, S.; LIU, W.; NANDETY, R.S.; et al. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. **The plant cell**, v. 32, n. 1, p. 15-41. 2020.

SAITOU, N., NEI, M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425. 1987.

SANTOS, P.E.; PALMER, M.; CHAVEZ-RAMIREZ, B.; et al. Whole genome analyses suggests that *Burkholderia* sensu lato contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the *Burkholderiaceae*. **Genes**, v. 9, n. 8. 2018.

SANTOS, L.A.; REIS, V.M. A formação do nódulo em leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 14 p., 2008.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R.S. Molecular signatures and phylogenomic analyses 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**, vol. 5. 2014.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A.V.; et al. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1187-1192. 2005.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M.J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, v. 17, n. 2, p. 91-109. 2016.

SHEU, S.; CHEN, M.; LIU, W.Y.Y.; et al. *Burkholderia dipogonis* sp. nov., isolated from root nodules of *Dipogon lignosus* in New Zealand and Western Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 4716-4723. 2015.

SILER, E.; FRIESEN, M.L.; Widespread negative frequency-dependent selection maintains diversity in the legume-rhizobia symbiosis: balancing nodulation may explain the paradox of Rhizobium diversity. **bioRxiv**. 2017.

SILVA, L.C. Isolamento e Caracterização de Bactérias de Nódulos de Mimosa sp. da Região Sul do Brasil. 2018. **Tese (Doutorado em Ciências Bioquímicas)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SILVEIRA, F.S. Estudos taxonômicos em *Mimosa* L. seção *Mimosa* (Fabaceae, Mimosoideae) no Rio Grande do Sul. 2015. **Dissertação (Mestre em Botânica)** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SIMON, M.F.; GRETHER, R.; QUEIROZ, L.P; et al. The evolutionary history of Mimosa (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. 1201-1221. 2011.

SPRENT, J.I.; ARDLEY, J.; JAMES, E.K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56. 2017.

STIRLING, D. DNA Extraction from Fungi, Yeast, and Bacteria. In: Bartlett J.M.S., Stirling D. (eds) PCR Protocols. **Methods in Molecular Biology**™, vol 226. Humana Press. 2003.

STOPNISEK, N.; BODENHAUSEN, N.; FREY, B. Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1503-1512. 2014.

STRENG, A.; CAMP, R.; BISSELING, T.; et al. Evolutionary origin of Rhizobium Nod factor signaling. **Plant signaling and Behavior**

SUVOROVA, I.A.; GELFAND, M.S. Comparative Genomic Analysis of the Regulation of Aromatic metabolism in Betaproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**. 2019.

TAYLOR, B.N.; SIMMS, E.L.; KOMATSU, K.J. More than a functional group: diversity within the legume-rhizobia mutualism and its relationship with ecosystem function. **Diversity**, v. 12, n. 2, p. 50. 2020.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W-M.; et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, n. 25, p. 507-512. 2002.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 761-778. 2014.

VELÁZQUEZ, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; RAMÍREZ-BAHENA, M-H.; et al. Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen fixing legume symbiosis. **Microbes for legume improvement**. Springer International Publishing, p. 1-43. 2017.

VELZEN, R.; HOLMER, R.; BU, F.; et al. Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses. **PNAS**, v. 115, n. 20, p. 4700-4709. 2018.

VETROVSKI, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2. 2013.

VINCENT, J.M. A manual for practical study of root nodule bacteria. **IBP Handbook**, n. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164p. 1970.

VIO, S.A; GARCIA, S.S.; CASAJUS, V.; et al. *Paraburkholderia*. *In*: AMARESAN, N.; KUMAR, M.S. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, Elsevier, cap. 15, p. 271-311. 2020.

WALKER, R. et al. Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes: Perspectives on the Diversity and Evolution of Nodulation by Rhizobium and Burkholderia Species. In: Wiley, J. **Biological Nitrogen Fixation**, v. 2, First Edition, cap. 89. 2015.

WEBER, C.F.; KING, G.M. Volcanic Soils as Sources of Novel CO-Oxidizing *Paraburkholderia* and *Burkholderia: Paraburkholderia hiiakae* sp. nov., *Paraburkholderia metrosideri* sp. nov., *Paraburkholderia paradisi* sp. nov., *Paraburkholderia peleae* sp. nov., and *Burkholderia alpina* sp. nov. a Member of the Burkholderia cepacia Complex. Frontiers in Microbiology, v. 8. 2017.

WERNER, G.D.A.; CORNWELL, W.K.; SPRENT, J.I.; et al. A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms. **Nature Communications**, v. 5. 2014.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiol. Immunol**., v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using *16S rRNA* gene sequences. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, p. 635–645. 2014.

ZHAO, S.; LUI, J.; BANERJEE, S.; et al. Soil pH is equally important as salinity in shaping bacterial communities in saline soils under halophytic vegetation. **Scientific Reports**, n. 8. 2018.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – Lista de estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. no Paraná e Santa Catarina.

Hospedeiro	Local de Coleta	Ano	Grupo CD- HIT	lsolado Tipo	16S rRNA	% id BLAST (NCBI)	N⁰ seq	recA	nifH	nodC	Nodula- ção
M. pudica	Morretes	2014	2	P30	Paraburkholderia caribensis	> 99	14	sim	sim	sim	sim
M. pudica	Morretes	2014	29	P19	Herbaspirillum frisingense	> 99	2	sim	não	não	não
M. pudica	Morretes	2014	16	P15	Cupriavidus necator	98.4	7	sim	sim	sim	sim
M. pudica	Morretes	2014	4	S11	Paraburkholderia M. rum	> 99	6	sim	não	não	não
M. pudica	Morretes	2014	2	S10	Paraburkholderia caribensis	> 99	4	sim	não	não	não
M. pudica	Morretes	2014	9	S1	Rhizobium multihospitium	> 99	3	sim	não	não	não
M. pudica	Blumenau	2016	4	BNU4.1	Paraburkholderia M. rum	> 99	10	sim	sim	sim	sim
M. pudica	Blumenau	2016	2	BNU6.4B	Paraburkholderia caribensis	> 99	1	sim	sim	sim	-
M. pudica	Blumenau	2016	170	BNU8.2	Paraburkholderia caribensis	98	1	sim	sim	sim	sim
M. dolens	São Luis do Purunã	2017	1	BN5.2	Paraburkholderia susongensis	98.2	7	sim	sim	sim	sim
M. dolens	São Luis do Purunã	2017	168	BN4.3.1	Herbaspirillum huttiense	98	1	sim	-	-	-

M. dolens	Recanto Papagaios	2018	24	89.3	Paraburkholderia susongensis	98.2	2	sim	sim	sim	-
M. dolens	Recanto Papagaios	2018	1	89.11	Paraburkholderia susongensis	98.4	2	-	-	-	-
M. dolens	Recanto Papagaios	2018	9	89.6	Rhizobium multihospitium	> 99	1	-	-	-	-
M. furfuracea	Recanto Papagaios	2018	151	CF15	Paraburkholderia susongensis	96.3	1	sim	sim	sim	-
M. furfuracea	Recanto Papagaios	2018	1	88.3.2	Paraburkholderia susongensis	98.3	6	sim	sim	sim	sim
M. furfuracea	Recanto Papagaios	2018	1	CF9	Paraburkholderia susongensis	98.2	5	sim	sim	sim	-
M. scabrella	Morro da Palha	2017	50	MP3.2	Paraburkholderia nodosa	> 99	1	sim	sim	sim	sim
M. scabrella	Morro da Palha	2017	49	MP1.1	Paraburkholderia hiiakae	98.5	2	sim	sim	sim	-
M. scabrella	Morro da Palha	2017	16	MP4.1	Cupriavidus necator	98.9	1	sim	sim	sim	sim
M. pilulifera	Recanto Papagaios	2018	9	90.13	Rhizobium multihospitium	> 99	1	-	-	-	-
M. pilulifera	Recanto Papagaios	2018	1	90.3	Paraburkholderia susongensis	98.5	1	-	-	-	-
M. murex	Quiriri	2016	6	9.2	Paraburkholderia peleae	> 99	3	sim	sim	sim	sim
M. murex	Quiriri	2016	51	9.6	Paraburkholderia dokdonella	97.8	1	sim	sim	sim	sim
M. murex	Quiriri	2016	3	11.13	Paraburkholderia peleae	98.7	4	sim	sim	sim	sim
M. murex	Quiriri	2016	0	9.19	Rhizobium laguerreae	> 99	4	sim	no	no	não
M. daleoides	Recanto Papagaios	2018	1	88.12	Paraburkholderia susongensis	98	6	sim	sim	sim	-
M. daleoides	Recanto Papagaios	2018	24	88.16	Paraburkholderia tuberum	97.7	1	-	-	-	-
M. congestifolia	Morro do Canal	2017	38	MC3.3	Paraburkholderia silviterrae	> 99	1	sim	sim	sim	-
M. congestifolia	Morro do Canal	2017	6	MC4	Paraburkholderia peleae	> 99	8	sim	-	-	-
M. congestifolia	Morro do Canal	2017	3	MC3.2	Paraburkholderia peleae	98.6	7	sim	no	no	não
M. congestifolia	Morro do Canal	2016	10	C1.53	Paraburkholderia peleae	98.9	6	-	-	-	-
M. hirsutula	Quiriri	2016	3	6.1	Paraburkholderia peleae	98.8	4	sim	sim	sim	sim
M. hirsutula	Quiriri	2016	10	6.3	Paraburkholderia peleae	98.9	2	sim	sim	sim	-
M. dryandroides	Recanto Papagaios	2017	1	RP2.3.1	Paraburkholderia susongensis	98	1	sim	sim	sim	sim
M. dryandroides	Recanto Papagaios	2017	24	RP7.2.2	Paraburkholderia susongensis	98	2	sim	-	-	-
M. piscatorum	Quiriri	2016	53	10.11.2	Paraburkholderia phytofirmans	98.9	2	sim	sim	sim	-
M. piscatorum	Quiriri	2016	13	10.7	Paraburkholderia phytofirmans	98.9	12	sim	sim	sim	-
M. pseudocal- losa	Morro do Canal	2016	3	Z5_2.78	Paraburkholderia peleae	98.8	2	-	-	-	-
M. pseudocal- losa	Morro do Canal	2016	10	Z6.86	Paraburkholderia peleae	98.7	5	-	-	-	-
M. gymnas	São Luis do Purunã	2014	0	NFN16	Rhizobium laguerreae	> 99	3	-	-	-	-
Mimosa sp.	Quiriri	2016	6	7.1	Paraburkholderia paleae	> 99	6	sim	sim	sim	sim
Mimosa sp.	Quiriri	2016	10	7.3	Paraburkholderia peleae	96.9	1	sim	-	-	-
Mimosa sp.	Quiriri	2016	51	7.10	Paraburkholderia peleae	97.9	1	-	-	-	-
Mimosa sp.	Quiriri	2016	3	7.11	Paraburkholderia peleae	98.8	1	sim	sim	sim	-
M. lanata	Recanto Papagaios	2014	11	NFN65	Bradyrhizobium sp.	> 99	1	-	-	-	-
M. regnelii	Ponta Grossa	2014	33	NFN78	Paraburkholderia aromaticivorans	> 99	2	-	-	-	-
M. pudica	Morretes	2014	218	P1	na	-	1	-	-	-	-
M. piscatorum	Quiriri	2016	219	10.11.1	na	-	1	-	-	-	-
M. pudica	Morretes	2014	220	P26	na	-	1	-	-	-	-
M. murex	Quiriri	2016	221	11.18	na	-	1	-	-	-	-
M. piscatorum	Quiriri	2016	222	10.6.1	na	-	1	-	-	-	-
M. hirsutula	Quiriri	2016	223	6.17	na	-	1	-	-	-	-
M. pudica	Morretes	2014	224	P5	na	-	1	-	-	-	-
M. hirsutula	Quiriri	2016	225	6.19	na	-	1	-	-	-	-

M. pudica	M. pudica Morretes		226	P28	na	-	1	-	-	-	-
M. pudica	Morretes	2014	227	S13	na	-	1	-	-	-	-
M. daleoides	Recanto Papagaios	2018	228	88.6	na	-	1	-	-	-	-
M. hirsutula	Quiriri	2014	229	6.7	na	-	1	-	-	-	-
M. piscatorum	Quiriri	2014	216	10.18	na	-	1	-	-	-	-
M. murex	Quiriri	2014	214	9.1	na	-	1	-	-	-	-
Mimosa sp.	Quiriri	2014	207	7.5	na	-	1	-	-	-	-
Mimosa sp.	Quiriri	2014	203	7.7	na	-	1	-	-	-	-
M. dolens	São Luis do Purunã	2017	191	BN4.2.1	na	-	1	-	-	-	-
M. congestifolia	Morro do Canal	2017	165	MC2.1	na	-	1	-	-	-	-
M. congestifolia	Morro do Canal	2017	163	MC5	na	-	1	-	-	-	-
M. pudica	Blumenau	2016	162	BNU5.3A	na	-	1	-	-	-	-
M. pudica	Blumenau	2016	158	BNU6.3	na	-	1	-	-	-	-
M. murex	Quiriri	2014	148	9.3	na	-	1	-	-	-	-
M. dolens	São Luis do Purunã	2017	156	BN3.6	na	-	1	-	-	-	-
Mimosa sp.	Quiriri	2014	56	2.12	na	-	1	-	-	-	-

FONTE: SILVA, 2018; MOREIRA, 2018; o próprio estudo (2022).

ANEXO 2 – Análises descritivas dos genes sequenciados a partir de estirpes selecionados isoladas de nódulos de *Mimosa* spp.



-		
-	۰.	
~		

Parâmetros	16S rRNA	recA	nifH	nodC
Número de sequências	189	65	24	25
Máximo (pb)	1534	1089	906	1236
Mínimo (pb)	414	486	300	192
Média (pb)	998.3	835.7	570.2	749.9
Desvio Padrão	353.8	114.3	216	249.6
Erro Padrão	25.74	14.18	44.09	49.92

a. Gráfico descritivo da média e desvio padrão dos genes sequenciados para as estirpes de interesse. Média e desvio padrão, em pares de base (pb), do tamanho das sequências para os genes:
 recA; ■ 16S rRNA; ▲ nifH; ▼ nodC.

b. Tabela de parâmetros descritivos para cada gene de interesse.

FONTE: o próprio estudo (2022).

ANEXO 3 - Alinhamento entre o gene 16S rRNA amplificado por meio de PCR convencional, e o gene 16S rRNA extraído do genoma sequenciado de estirpes isoladas a partir de nódulos de Mimosa spp.

a. Estirpe 10.7

NODE_75_length_5329_cov_447.640138 nce ID: Query 64455 Length: 5329 Number of Matches: 1

Range 1: 3767 to 5	139 Graphics	1		Vext Match	Previous I	Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Query	661	ç
2483 bits(1344)	0.0	1366/1376(99%)	3/1376(0%)	Plus/Minus	 Sbjct 	4479	ċ

Score	hite(1344	Expect	Identities	Gaps 2/1276(0%)	Strand Plus/Min		Query	661	CGATGGCGAAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAG	720
2400	0103(1044	t) 0.0	1000/10/0(00/0)	3/13/0(0/0)	Prosy Milli		Sbjct	4479	CGATGGCGAA-GGCAGCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAG	4421
Query	1	CATGCAAGTCGAACO	GCAGCACGGGGGCAAC	CTGGTGGCGAGTGGCGAAC	GGGTGAGTA	60	Query	721	CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGGTTGTCGGG	780
Sbjct	5139	CATGCAAGTCGAACO	GGCAGCACGGGGGGCAAC	CTGGTGGCGAGTGGCGAAC	GGGTGAGTA	5080	Sbjct	4420	CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAG-TTGTCGGG	4362
Query	61	ATACATCGGAACGT	STCCTGTAGTGGGGGAT	AGCCCGGCGAAAGCCGGATT.	AATACCGCA	120	Query	781	TCTTCATTTGACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGCTGACCGCCTGGGGAGTACGGTC	840
Sbjct	5079	ATACATCGGAACGT	STCCTGTAGTGGGGGAT	AGCCCGGCGAAAGCCGGATT	AATACCGCA	5020	Sbjct	4361	TCTTCATT-GACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTC	4303
Query	121	TACGATCTGTGGAT	GAAAGCGGGGGGATCTTA	GACCTCGCGCTACAGGGGC	GGCCGATGG	180	Ouerv	841	GCAAGATTAAAAACTCAAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATT	988
Sbjct	5019	TACGATCTGTGGAT	GAAAGCGGGGGGATCTTA	GACCTCGCGCTACAGGGGC	GGCCGATGG	4960	Shirt	4392		4243
Query	181	CAGATTAGCTAGTT	GTGGGGTAAAGGCCTA	CCAAGGCGACGATCTGTAGC	TGGTCTGAG	240	Ouerv	991	AATTEGATGEAACGEGAAAACEETTAEETTAEETTIGAEATGEATGEATGEATGEATGEAAGAG	968
Sbjct	4959	CAGATTAGCTAGTTO	GTGGGGTAAAGGCCTA	CAAGGCGACGATCTGTAGC	TGGTCTGAG	4900	Shirt	4242		4192
Ouerv	241	AGGACGACCAGCCA		GCCCAGACTCCTACGGGAG	GCAGCAGTG	300	SUJEE	4242		4165
Shict	4899					4840	Query	961	GTGGGAGTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT	1020
Oueeu	201	GGGANTTTTGGACA		CAGCANTECCECETETE		260	Sbjct	4182	GTGGGAGTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT	4123
Query	201					200	Query	1021	CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTCCGCAA	1080
Sbjct	4839	GGGAATTTTGGACAA	ATGGGCGCAAGCCTGAT	CCAGCAATGCCGCGTGTGTG	AAGAAGGCC	4780	Sbjct	4122	CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAA	4063
Query	361	TTCGGGTTGTAAAG	CACTTTTGTCCGGAAAG	AAACCTCTGGGTTAATACC	CTGGGGGGA	420	Query	1081	GAGCACTCTAGGGAGACTTCCGGTGACAATCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC	1140
Sbjct	4779	TTCGGGTTGTAAAG	CACTTTTGTCCGGAAAG/	AAACCTCTGGGTTAATACC	CTGGGGGGA	4720	Sbjct	4062	GAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC	4003
Query	421	TGACGGTACCGGAAG	GAATAAGCACCGGCTAA	TACGTGCCAGCAGCCGCGG	TAATACGTA	480	Query	1141	TCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCA	1200
Sbjct	4719	TGACGGTACCGGAAG	GAATAAGCACCGGCTAA	TACGTGCCAGCAGCCGCGG	TAATACGTA	4660	Sbjct	4002	TCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCA	3943
Query	481	GGGTGCAAGCGTTA	ATCGGAATTACTGGGCG	TAAAGCGTGCGCAGGCGGTT	CGCTAAGAC	540	Query	1201	ACCCGCGAGGGGGGGGGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACT	1260
Sbjct	4659	GGGTGCAAGCGTTAA	ATCGGAATTACTGGGCG	TAAAGCGTGCGCAGGCGGTT	CGCTAAGAC	4600	Sbict	3942	ACCCGCGAGGGGGGGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACT	3883
Query	541	AGATGTGAAATCCCC	CGGGCTTAACCTGGGAA	TGCATTTGTGACTGGCGGG	CTAGAGTAT	600	Ouerv	1261	COAGTOCOTOGAACCTOGAATCOCTAGTAATCOCOGATCAGCATOCCGCOGTGAATACOTT	1320
Sbjct	4599	AGATGTGAAATCCCC	CGGGCTTAACCTGGGAA	TGCATTTGTGACTGGCGGG	CTAGAGTAT	4540	Chief	2002		2022
Ouerv	601	GGCAGAGGGGGGGTAG	GAATTCCACGTGTAGCA	GTGAAATGCGTAGAGATGTG	GAGGAATAC	660	sujct	3682	COACTORAGE FOR A FOULTAGE ACTORE ACTORES CONTRACTORES CONTRACTORES	3623
Shict	4539					1180	Query	1321	CCCGGGTCTTGTACCCTCCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTG 1376	ز
Jujuu	4333	aachahaddddd i A	and received of Adea	an annound contracted that and a north	GROUPPAT AC	4400	Sbjct	3822	CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTG 3767	/

b. Estirpe 88.12

id=1 original=1.1 Sequence ID: Query_62004 Length: 5201 Number of Matches: 1

Range 1: 3669 to 5064 Graphics Next Match Sbjct 4408 ATACCGATGGCGAAGGCCCCTGGGTCAATACTGACGCTCATGCCAGGCCCTAAAGGCATGGGGG Score Expect Identifies Gaps Strand Query 719 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTGACCAGCCCCTAAAGGATGTCAACGGCCCAAAGGATGTGCAACGGCCCCAAGGAGTGAGT	718
Score Expect Identities Gaps Strand Query 719 GAGCAAACAGGATTAGATCCCCTGGAGTCCACGCGCTAAGGATGTGTCG 2547 bits(1379) 0.0 1394/1400(99%) 6/1400(0%) Plus/Minus Sbjct 4348 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGCCAACGCGTGAGTGGTGGGGGGGG	4349
2547 bits(1379) 0.0 1394/1400(99%) 6/1400(0%) Plus/Minus Sbjct 4348 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGCCTAAACGGTGTGACAGTGGTAGTGGA Query 1 TGC-AGTCG-ACGGCAGCACGGGGGGAACCCTGGTGGCGAACGGGGGGGTAAT 58 Query 779 GGCCTTCATTGGCTGGTAGCGACGGGGGAAGTGGCGAACGGGGGGGG	778
Query 1 TGC-AGTCG-ACGGCGGCAACCCGGGGGGCAACCCTGGGGGGGGGG	4289
Sbjet 5964 TGCAAGTCGAAGCGCAGCGGGGAAACCCCTGGTGGCGAAGCGCGGGGGGAGGGGGGGG	838
Query 59 ACATCGGAACGTTCCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGGATAATAATACCGGATA 118 Query 839 CGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATGACGGGGGACCCGGACAAGCGGTGGATGATGTGGAT Sbjct 5004 ACATCGGAACGTTCCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATAATACCGCATA 4945 Sbjct 4228 CGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGAACCCGGATGATGTGGAT Query 119 CGCTCTGTGGAGGAAAGCCGGGGGATAGCCCGGCGCAAGGGGGGCGGCCGATGG 178 Query 899 TAATTCGATGCAAAGCGAAAACCTTAACCTTGGCAACCCGGCTGAAGGAGTGGATGGTGGAT Sbjct 494 CGCTCTGTGGAGGAAAGCGGGGGATCTTTCGGGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGG 178 Query 899 TAATTCGATGCAAACCCGAAAAACCTTACCTTGCACATGTATGGAAACCCCGCTGAAG Sbjct 4944 CGCTCTGTGGAGGAAAGCGGGGGAACCTTTCCGGGCCGCCGACGA 4885 Sbjct 4168 TAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTGACGTGATGTATGT	4229
Sbjet 5004 ACATEGGAACGTGTCCTGGAGGGGATAGCCCGGGGAAAGCCCGGGAAAGCCCGGAAAGCCGGGATTAATACCGCATA 4945 Sbjet 4228 CGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGACCCGCACAAGGCGGGGATGATGATGTGGATGATGAGGGGGG Query 119 CGCTCTGTGGAGGAAAGCGGGGGGATCTTTCGGGACCTCGCGCTCAAGGGGGGGG	898
Query 119 CGCTCTGTGGAGGAAAAGCGGGGGATCTTTCGGGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGG 178 Query 899 TAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTTACCTTGCACATGTATGGAACCCCGCTGAAG Sbjct 4944 CGCTTCTGGAGGAAAAGCGGGGGATCTTTCGGGACCTGCGCGCCAAGGGGCGGCCGATGG 4885 Sbjct 4168 TAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTTGCACATGTATGGAACCCCGCCTGAAGG Query 10	4169
Sbjet 4944 CGCTCTGTGGAGGAAAAGCGGGGGATCTTTCGGGACCTCGCGCTCAAGGGGGGGCCGATGG 4885 Sbjet 4168 TAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCTTGACATGTATGGAACCCCGCTGAGA	958
A 470 - FIFTHEFTHEFTEFTEFTEFTEFTEFTEFTEFTEFTEFTEFTEFTEFTE	4109
Query 1/9 CAGATIAGGAGGGGGGGGGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGGGGGGG	1018
Sbjct 4884 CAGATTAGGTAGGTGGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAG 4825 Sbjct 4188 GGTGGGGGGGCGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTCGACAGCTCGGC	4049
Query 239 AGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG 298 Query 1019 TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCA	1078
Sbjct 4824 AGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG 4765 Sbjct 4048 TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGGCGACCCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCA	3989
Query 299 GGGAATTTTGGACAATGGGGGGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC 358 Query 1079 AGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC	1138
Sbjct 4764 GGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC 4705 Sbjct 3988 AGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGGGAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC	3929
Query 359 TTC6GGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCTGGGTTAATACCCCGGGGGGGA 418 Query 1139 CTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACAACGATGGTCGGAACAGAGGGTTGCC	1198
Sbjct 4704 TTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCTGGGTTAATACCCCGGGGGGA 4645 Sbjct 3928 CTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACAACGCACTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCC	3869
Query 419 TGACGGGTACCGGGAAGAATAAGCACCGGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA 478 Query 1199 AAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAAC	1258
Sbjct 4644 TGACGG-TACC-GGAAGAATAAGCACCGG-CT-AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA 4589 Sbjct 3868 AAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAAC	3809
Query 479 CGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGATGTA 538 Query 1259 TCGAGTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT	1318
Sbjct 4588 CGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGGATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGATGTA 4529 Sbjct 3808 TCGAGTGCGTGAAGCTGGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGGATCAGCAGCGGGGGAAAGCG	3749
Query 539 AGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGCATCGCTCGA 598 Query 1319 TCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCT	1378
Sbjct 4528 AGACCGATGTGAAATCCCCGGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGCATCGCTCGA 4469 Sbjct 3748 TCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCT	3689
Query 599 GTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAAGATGTGGAGGA 658 Query 1379 AGTCTAACCGCAAGGAGGAC 1398	
Sbjct 4468 GTATGGCAGAGGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAGAGATGTGGAGGA 4409 Sbjct 3688 AGTCTAACCGCAAGGAGGAC 3669	

c. Estirpe 89.3

id=1 original=1.1

Sequence ID: Query_40879 Length: 5072 Number of Matches: 1

Range	1: 371	8 to 5072 Graphics		Vext Next I	Match 🔺 🛉	Previous N	latch			
Score	-it-(100	Expect	Identities	Gaps	Strand		Query	685	ACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGGGGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC	744
24701	0105(100	./) 0.0	1330/1336(99%)	2/1336(0%)	Plus/ Milli	us	SUJEC	4412	ACTORCOCTORTOCACOAAAGCOTOGOGAACAAACAGGATTAGATACCOTOGTAGTCCAC	4355
Query	25	CCTGGTGGCGAGTG	CGAACGGGTGAGTAATACAT			84	Query	745		804
Sbjct	5072	CCTGGTGGCGAGTG	SCGAACGGGTGAGTAATACAT	CGGAACGTGTCCTGGA	STGGGGGAT	5013	Sbjct	4352	GCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCCTTCATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCG	4293
Query	85	AGCCCGGCGAAAGC	CGGATTAATACCGCATACGC	CTGTGGAGGAAAGCGG	GGATCTTT	144	Query	805	TGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA	864
Sbjct	5012	AGCCCGGCGAAAGC	GGATTAATACCGCATACGCT	CTGTGGAGGAAAGCGG	GGATCTTT	4953	Sbjct	4292	TGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA	4233
Query	145	CGGGACCTCGCGCT	CAAGGGGCGGCCGATGGCAGA	TTAGGTAGTTGGTGGG	GTAAAGGCC	204	Query	865	CCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACC	924
Sbjct	4952	CGGGACCTCGCGCT	CAAGGGGCGGCCGATGGCAGA	TTAGGTAGTTGGTGGG	GTAAAGGCC	4893	Sbjct	4232	CCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAAACCTTACCTACC	4173
Query	205	TACCAAGCCGACGA	TCTGTAGCTGGTCTGAGAGGA	CGACCAGCCACACTGG	GACTGAGAC	264	Query	925	CTTGACATGTATGGAACCTGGCTGAGAGGCTGGG-GTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACA	983
Sbjct	4892	TACCAAGCCGACGA	CTGTAGCTGGTCTGAGAGGA	CGACCAGCCACACTGG	GACTGAGAC	4833	Sbjct	4172	CTTGACATGTATGGAATCCCGCTGAGAGG-TGGGAGTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACA	4114
Query	265	ACGGCCCAGACTCC	ACGGGAGGCAGCAGTGGGGA	ATTTTGGACAATGGGC	GCAAGCCTG	324	Query	984	GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	1043
Sbjct	4832	ACGGCCCAGACTCC	ACGGGAGGCAGCAGTGGGGA	ATTTTGGACAATGGGC	GCAAGCCTG	4773	Sbjct	4113	GGTGCTGCATGGCTGTCGTCGTCAGCTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG	4054
Query	325	ATCCAGCAATGCCG	GTGTGTGAAGAAGGCCTTCC	GGTTGTAAAGCACTTT	TGTCCGGAA	384	Query	1044	CGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAAC	1103
Sbjct	4772	ATCCAGCAATGCCG	GTGTGTGAAGAAGGCCTTC	GGTTGTAAAGCACTTT	TGTCCGGAA	4713	Sbjct	4053	CGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAAC	3994
Query	385	AGAAAACCTCTGGG	TAATACCCCGGGGGGGATGAC	GGTACCGGAAGAATAA	GCACCGGCT	444	Query	1104	CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGT	1163
Sbjct	4712	AGAAAACCTCTGGG	TAATACCCCGGGGGGGATGAC	GGTACCGGAAGAATAA	GCACCGGCT	4653	Sbjct	3993	CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGT	3934
Query	445	AACTACGTGCCAGC	AGCCGCGGTAATACGTAGGGT	GCGAGCGTTAATCGGA	ATTACTGGG	504	Query	1164	CATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACC	1223
Sbjct	4652	AACTACGTGCCAGC	AGCCGCGGTAATACGTAGGGT	GCGAGCGTTAATCGGA	ATTACTGGG	4593	Sbjct	3933	CATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACC	3874
Query	505	CGTAAAGCGTGCGC	AGGCGGTGATGTAAGACCGAT	GTGAAATCCCCGGGCT	TAACCTGGG	564	Query	1224	GATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGGGTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC	1283
Sbjct	4592	CGTAAAGCGTGCGC	AGGCGGTGATGTAAGACCGAT	GTGAAATCCCCGGGCT	TAACCTGGG	4533	Sbjct	3873	GATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC	3814
Query	565	AACTGCATTGGTGA	TGCATCGCTCGAGTATGGCA	GAGGGGGGGTAGAATTC	CACGTGTAG	624	Query	1284	GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACC	1343
Sbjct	4532	AACTGCATTGGTGA	TGCATCGCTCGAGTATGGCA	GAGGGGGGGTAGAATTC	CACGTGTAG	4473	Sbjct	3813	GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACC	3754
Query	625	CAGTGAAATGCGTA	SAGATGTGGAGGAATACCGAT	GGCGAAGGCAGCCCCC	TGGGTCAAT	684	Query	1344	ATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAAC 1379	
Sbjct	4472	CAGTGAAATGCGTA	GAGATGTGGAGGAATACCGAT	GGCGAAGGCAGCCCCC	TGGGTCAAT	4413	Sbjct	3753	ATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAAC 3718	

id=1 original=1.1 Sequence ID: Query_296197 Length: 5418 Number of Matches: 1 Range 1: 3679 to 5063 <u>Graphics</u>

Range	1: 3679	to 5063 Graphics			Vext Next	Aatch 🔺	Previous	Match		
Score		Expect	Identities	Gaps	Strand		Query	720	AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCC	779
2542	bits(137	6) 0.0	1383/1386(99%)	2/1386(0%)	Plus/Min	US	. Sbjct	4343	AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCC	4284
Query	1	TGCAAGTCGAACGGC	AGCACGGGGGGCAACCCTGGT	GGCGAGTGGCGAACGG	STGAGTAA-	59	Query	780	TTCATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA	839
Sbjct	5063	TGCAAGTCGAACGGC	AGCACGGGGGGCAACCCTGGT	GGCGAGTGGCGAACGG	STGAGTAAT	5004	Sbjct	4283	TTCATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA	4224
Query	60	ACAACGGAACGTGTC	CTGGAGTGGGGGGATAGCCCG	GCGAAAGCCGGATTAA	TACCGCATA	119	Query	840	AGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAT	899
Sbjct	5003	ACATCGGAACGTGTC	CTGGAGTGGGGGGATAGCCCG	GCGAAAGCCGGATTAA	TACCGCATA	4944	Sbjct	4223	AGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAT	4164
Query	120	CGCTCTGTGGAGGAA	AGCGGGGGGATCTTTCGGGAC	CTCGCGCTCAAGGGGC	GCCGATGG	179	Query	900	TCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAACCCCGCTGAGAGGTG	959
Sbjct	4943	CGCTCTGTGGAGGAA	AGCGGGGGGATCTTTCGGGAC	CTCGCGCTCAAGGGGCC	GCCGATGG	4884	Sbjct	4163	TCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAACCCCGCTGAGAGGTG	4104
Query	180	CAGATTAGGTAGTTG	GTGGGGTAAAGGCCTACCAA	GCCGACGATCTGTAGC	IGGTCTGAG	239	Query	960	GGGGTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT	1019
Sbjct	4883	CAGATTAGGTAGTTG	GTGGGGTAAAGGCCTACCAA	GCCGACGATCTGTAGC	IGGTCTGAG	4824	Sbjct	4103	GGGGTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTCGTCGT	4044
Query	240	AGGACGACCAGCCAC	ACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAG	SCAGCAGTG	299	Query	1020	GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAG	1079
Sbjct	4823	AGGACGACCAGCCAC	ACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAG	SCAGCAGTG	4764	Sbjct	4043	GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAG	3984
Query	300	GGGAATTTTGGACAA	TGGGCGCAAGCCTGATCCAG	CAATGCCGCGTGTGTG/	AAGAAGGCC	359	Query	1080	CACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA	1139
Sbjct	4763	GGGAATTTTGGACAA	TGGGCGCAAGCCTGATCCAG	CAATGCCGCGTGTGTG	AAGAAGGCC	4704	Sbjct	3983	CACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA	3924
Query	360	TTCGGGTTGTAAAGC	ACTTTTGTCCGGAAAGAAAA	CCTCTGGGTTAATACC	CGGGGGGGA	419	Query	1140	TGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGC	1199
Sbjct	4703	TTCGGGTTGTAAAGC	ACTTTTGTCCGGAAAGAAAA	CCTCTGGGTTAATACCO	CGGGGGGGA	4644	Sbjct	3923	TGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGC	3864
Query	420	TGACGGTACCGGAAG	AATAAGCACCGGCTAACTAC	GTGCCAGCAGCCGCGG	TAATACGTA	479	Query	1200	CGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGA	1259
Sbjct	4643	TGACGGTACCGGAAG	AATAAGCACCGGCTAACTAC	GTGCCAGCAGCCGCGG	TAATACGTA	4584	Sbjct	3863	CGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGA	3804
Query	480	GGGTGCGAGCGTTAA	TCGGAATTACTGGGCGTAAA	GCGTGCGCAGGCGGTG/	ATGTAAGAC	539	Query	1260	GTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC	1319
Sbjct	4583	GGGTGCGAGCGTTAA	TCGGAATTACTGGGCGTAAA	GCGTGCGCAGGCGGTG	ATGTAAGAC	4524	Sbjct	3803	GTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC	3744
Query	540	CGATGTGAAATCCCC	GGGCTTAACCTGGGAACTGC	ATTGGTGACTGCATCG	TCGAGTAT	599	Query	1320	GGGTCTTGTACACCGCCCGTCTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGT	1379
Sbjct	4523	CGATGTGAAATCCCC	GGGCTTAACCTGGGAACTGC	ATTGGTGACTGCATCG	TCGAGTAT	4464	Sbjct	3743	GGGTCTTGTACACACCGCCCGTC-ACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGT	3685
Query	600	GGCAGAGGGGGGTAG	AATTCCACGTGTAGCAGTGA	AATGCGTAGAGATGTG	SAGGAATAC	659	Query	1380	CTAACC 1385	
Sbjct	4463	GGCAGAGGGGGGGTAG	AATTCCACGTGTAGCAGTGA	AATGCGTAGAGATGTG	SAGGAATAC	4484	Sbjct	3684	CTAACC 3679	
Query	660	CGATGGCGAAGGCAG	CCCCCTGGGTCAATACTGAC	GCTCATGCACGAAAGC	STGGGGAGC	719				
Sbjct	4403	CGATGGCGAAGGCAG	CCCCCTGGGTCAATACTGAC	GCTCATGCACGAAAGC	STGGGGAGC	4344				

e. Estirpe MP1.1

id=79 original=1.79

id=79 Sequer	79 original=1.79 juence ID: Query_285994 Length: 5052 Number of Matches: 1							600 4198	CAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCG	659 4139
Range	1: 340	0 to 4798 Graphics			V Next N	Aatch 🔺	Query	660	ATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA	719
Score		Expect	Identities	Gaps	Strand		Sbjct	4138	ATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA	4079
2560 b	oits(138	6) 0.0	1395/1399(99%)	1/1399(0%)	Plus/Minu	JS	Query	720	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCCTT	779
Query	1	TGCAAGTCGAACGGC	AGCGCGGGAGCAATCCTGGCG	GCGAGTGGCGAACGGG	TGAGGGA-	59	Sbjct	4078	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCCTT	4019
Sbjct	4798	TGCAAGTCGAACGGC	AGCGCGGGAGCAATCCTGGCG	GCGAGTGGCGAACGGG	TGAGTAAT	4739	Query	780	CATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG	839
Query	60	GCATCGGAACATGTC	CAGTAGTGGGGGGATAGCCCGG	CGAAAGCCGGATTAAT	ACCGCATA	119	Sbjct	4018	CATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG	3959
Sbjct	4738	ACATCGGAACATGTC	CAGTAGTGGGGGGATAGCCCGG	CGAAAGCCGGATTAAT	ACCGCATA	4679	Query	840	ATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTC	899
Query	120	CGATCTATGGATGAA	AGCGGGGGGATCGCAAGACCTC	GCGCTATTGGGGTGGC	CGATGGCG	179	Sbjct	3958	ATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTC	3899
Sbjct	4678	CGATCTATGGATGAA	AGCGGGGGGATCGCAAGACCTC	GCGCTATTGGGGTGGC	CGATGGCG	4619	Query	900	GATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAAGTCCGCTGAGAGGTGGA	959
Query	180	GATTAGCTAGTTGGT	GGGGTAAAGGCCCACCAAGGC	GACGATCCGTAGCTGG	TCTGAGAG	239	Sbjct	3898	GATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAAGTCCGCTGAGAGGTGGA	3839
Sbjct	4618	GATTAGCTAGTTGGT	GGGGTAAAGGCCCACCAAGGC	GACGATCCGTAGCTGG	TCTGAGAG	4559	Query	960	TGTGCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA	1019
Query	240	GACGACCAGCCACAC	TGGGACTGAGACACGGCCCAG	ACTCCTACGGGAGGCA	GCAGTGGG	299	Sbjct	3838	TGTGCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGTGA	3779
Sbjct	4558		TGGGACTGAGACACGGCCCAG	ACTCCTACGGGAGGCA	GCAGTGGG	4499	Query	1020	GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCA	1079
Ouerv	300	GAATTTTGGACAATG	GGCGCAAGCCTGATCCAGCAA	TGCCGCGTGTGTGAAG	AAGGCCTT	359	Sbjct	3778	GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCA	3719
Shict	4498					4439	Query	1080	CTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATG	1139
Ouerv	360	COGGTTGTAAAGCAC	TITIGTCCGGAAAGAAATCCT	GATGGCTAATATCCGT	CEEEEATE	410	Sbjct	3718	CTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATG	3659
Shict	4439					4270	Ouerv	1140	GCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCG	1199
Oueeu	4430		TAAGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	GATGGETAATATEEGT	TACCTACC	4373	Shict	3658		3500
Query	420					479	Ouerv	1288		1259
SDJCT	4378	ACGGTACCGGAAGAA	TAAGCACCGGCTAACTACGTG	CCAGCAGCCGCGGTAA	TACGTAGG	4319	Christ	2509		2520
Query	480	GTGCGAGCGTTAATC	GGAATTACTGGGCGTAAAGCG		TAAGACCG	539	Ouenu	1260		1210
Sbjct	4318	GTGCGAGCGTTAATC	GGAATTACTGGGCGTAAAGCG	TGCGCAGGCGGTGATG	TAAGACCG	4259	Query	1260		1519
Query	540	ATGTGAAATCCCCGG	GCTTAACCTGGGAACTGCATT	GGTGACTGCATCGCTG	GAGTATGG	599	Sbjct	3538	GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG	3479
Sbjct	4258	ATGTGAAATCCCCGG	GCTTAACCTGGGAACTGCATT	GGTGACTGCATCGCTG	GAGTATGG	4199	Query	1320	GTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTA	1379
							Sbjct	3478	GTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTA	3419
							Query	1380	ACCGCAAGGAGGACGGTCA 1398	
							Shict	3418	ACC6CAA66A66AC66TCA 3499	

f. Estirpe 7.1

P71_\$12_L001_R1_001_(paired)_contig_47

Sequence ID: Query_33520 Length: 5371 Number of Matches: 1

Range	1: 184 1	to 1560 Graphics			Vext N	latch 🔺	Previous	Match		
Score 2516	bits(136)	Expect 2) 0.0	Identities 1373/1378(99%)	Gaps 1/1378(0%)	Strand Plus/Plu		Query	661	GCGAAGGCAGCCCCCTGGGTCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACA	720
Query	1		CGGGAGCAATCCTGGCGGCG		ΤΑΑΤΑCAT	60	Ouenv	845 701	GEDAADGEAGEEEEE TOGGEEAATAE TOAEGETEATGEAGGETTEAT	7902
Sbict	184			AGTGGCGAACGGGTGAG	TAATACAT	243	Shict	983		962
Ouerv	61	CGGAACATGTCCAGT	AGTGGGGGGATAGCCCGGCGA	AAGCCGGATTAATACCG	CATACGAT	120	Ouerv	781	IGGETTAGETAACGAAGCTAACGCGIGAAGTIGACGCTGGGGGAGTACGGICGCAAGATI	849
Sbjct	244	CGGAACATGTCCAGT	AGTGGGGGGATAGCCCGGCGA	AAGCCGGATTAATACCG	CATACGAT	303	Shict	963		1022
Query	121	CTACGGATGAAAGCG	GGGGATCGCAAGACCTCGCG	CTATTGGGGTGGCCGAT	GGCGGATT	180	Ouerv	841	AAAAACTCAAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGAT	900
Sbjct	304	CTACGGATGAAAGCG	GGGATCGCAAGACCTCGCG	CTATTGGGGTGGCCGAT	GGCGGATT	363	Sbjct	1023	AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGAT	1082
Query	181	AGCTAGTTGGTGGGG	TAAAGGCCTACCAAGGCGAC	GATCCGTAGCTGGTCTG	AGAGGACG	240	Query	901	GCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCCCGCCGAGAGGTGGGGGGT	960
Sbjct	364	AGCTAGTTGGTGGGG	TAAAGGCCTACCAAGGCGAC	GATCCGTAGCTGGTCTG	AGAGGACG	423	Sbjct	1083	GCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCCTGCCGAGAGGTGGGTG	1142
Query	241	ACCAGCCACACTGGG	ACTGAGACACGGCCCAGACT	CCTACGGGAGGCAGCAG	TGGGGAAT	300	Query	961	GCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAT	1020
Sbjct	424	ACCAGCCACACTGGG	ACTGAGACACGGCCCAGACT	CCTACGGGAGGCAGCAG	TGGGGAAT	483	Sbjct	1143	GCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCGTCAGCTCGTGAGAT	1202
Query	301	TTTGGACAATGGGCG	CAAGCCTGATCCAGCAATGC	CGCGTGTGTGAAGAAGG		360	Query	1021	GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTC	1080
Sbjct	484	TTTGGACAATGGGCG	CAAGCCTGATCCAGCAATGC	CGCGTGTGTGAAGAAGG	CCTTCGGG	543	Sbjct	1203	GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTC	1262
Query	361	TTGTAAAGCACTTTT	GTCCGGAAAGAAATCCTCTG	GGTTAATACCCCGGGGG	GATGACGG	420	Query	1081	CAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCC	1140
Sbjct	544	TTGTAAAGCACTTTT	STCCGGAAAGAAATCCTCTG	GGTTAATACCCCGGGGG	GATGACGG	603	Sbjct	1263	CAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCC	1322
Query	421	TACCGGAAGAATAAG	CACCGGGCTAACTACGTGCC	AGCAGCCGCGGTAATAC	GTAGGGTG	480	Query	1141	CTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGA	1200
Sbjct	604	TACCGGAAGAATAAG	CACC-GGCTAACTACGTGCC	AGCAGCCGCGGTAATAC	GTAGGGTG	662	Sbjct	1323	CTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGA	1382
Query	481	CGAGCGTTAATCGGA	ATTACTGGGCGTAAAGCGTG	CGCAGGCGGTGATGCAA	GACCGATG	540	Query	1201	GGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG	1260
Sbjct	663	ĊĠĂĠĊĠŤŤĂĂŤĊĠĠĂ/	ATTACTGGGCGTAAAGCGTG	ĊĠĊĂĠĠĊĠĠŦĠĂŦĠĊĂĂ	ĠĂĊĊĠĂŤĠ	722	Sbjct	1383	GGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG	1442
Query	541	TGAAATCCCCGGGCT	TAACCTGGGAACTGCATTGG	TGACTGCATCGCTAGAG	TATGGCAG	600	Query	1261	TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC	1320
Sbjct	723	TGAAATCCCCGGGCT	TAACCTGGGAACTGCATTGG	TGACTGCATCGCTGGAG	TATGGCAG	782	Sbjct	1443	TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC	1502
Query	601	AGGGGGGGTAGAATTCO	CACGTGTAGCAGTGAAATGC	GTAGAGATGTGGAGGAA	TACCGATG	660	Query	1321	TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTAA 1	1378
Sbjct	783	AGGGGGGGTAGAATTC	CACGTGTAGCAGTGAAATGC	GTAGAGATGTGGAGGAA	TACCGATG	842	Sbjct	1503	TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTAA 1	1560

g. Estirpe 9.2

Bmimosarum92_S9_L001_R1_001_(paired)_contig_87									721	CGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	780
S	equer	ce ID: (Query_321284	Length: 5411 Number of	of Matches: 1			Sbjct	4528	CGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG	4469
Range 1: 3715 to 5248 Graphics Vext Match								Query	781	GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCCTTCATT	840
5	core		Expect	Identities	Gans	Strand		Sbjct	4468	GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCCTTCATT	4409
2	833 b	its(153	4) 0.0	1534/1534(100%)	0/1534(0%)	Plus/Min	us	Query	841	GGCTTGGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA	900
Qı	uery	1	TAAACTGAAGAGTT	TGATCCTGGCTCAGATTGAAG	GCTGGCGGCATGCCTT	ACACATGCA	60	Sbjct	4408	GGCTTGGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA	4349
SI	bjct	5248	TAAACTGAAGAGTT	TGATCCTGGCTCAGATTGAA	GCTGGCGGCATGCCTT	ACACATGCA	5189	Query	901	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATG	960
Qı	uery	61	AGTCGAACGGCAGG	GCGGGAGCAATCCTGGCGGCG	GAGTGGCGAACGGGTGA	GTAATACAT	120	Sbjct	4348	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATG	4289
SI	bjct	5188	AGTCGAACGGCAG	GCGGGAGCAATCCTGGCGGCG	GAGTGGCGAACGGGTGA	GTAATACAT	5129	Query	961	CAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCCTGCCGAGAGGTGGGGGGTG	1020
Qı	uery	121	CGGAACATGTCCAG	TAGTGGGGGGATAGCCCGGCGA	AAAGCCGGATTAATACC	GCATACGAT	180	Sbjct	4288	CAACGCGAAAAACCTTACCTACCTTGACATGTACGGAACCCTGCCGAGAGGTGGGGGGTG	4229
SI	bjct	5128	CGGAACATGTCCAG	TAGTGGGGGGATAGCCCGGCGA	AAGCCGGATTAATACC	GCATACGAT	5069	Query	1021	CCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGAGATG	1080
Qı	uery	181	CTACGGATGAAAGG	GGGGGGATCGCAAGACCTCGCC	SCTATTGGGGTGGCCGA	TGGCGGATT	240	Sbjct	4228	CCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATG	4169
SI	bjct	5068	CTACGGATGAAAGO	GGGGGATCGCAAGACCTCGC	SCTATTGGGGTGGCCGA	TGGCGGATT	5009	Query	1081	TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCC	1140
Q	uery	241	AGCTAGTTGGTGGG	GTAAAGGCCTACCAAGGCGAG	GATCCGTAGCTGGTCT	GAGAGGACG	300	Sbjct	4168	TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCC	4109
SI	bjct	5008	AGCTAGTTGGTGGG	GTAAAGGCCTACCAAGGCGAG	GATCCGTAGCTGGTCT	GAGAGGACG	4949	Query	1141	AGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC	1200
Q	uery	301	ACCAGCCACACTGO	GACTGAGACACGGCCCAGACT	ICCTACGGGAGGCAGCA	GTGGGGAAT	360	Sbjct	4108	AGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC	4049
SI	bjct	4948	ACCAGCCACACTGO	GACTGAGACACGGCCCAGAC	I CCTACGGGAGGCAGCA	GTGGGGAAT	4889	Query	1201	TTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAG	1260
Qı	uery	361	TTTGGACAATGGGG	GCAAGCCTGATCCAGCAATG	CCGCGTGTGTGAAGAAG	GCCTTCGGG	420	Sbjct	4048	TTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAG	3989
SI	bjct	4888	TTTGGACAATGGGG	GCAAGCCTGATCCAGCAATG	CGCGTGTGTGAAGAAG	GCCTTCGGG	4829	Query	1261	GTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT	1320
Qı	uery	421	TTGTAAAGCACTTI	TGTCCGGAAAGAAATCCTCTC	GGTTAATACCCCGGGG	GGATGACGG	480	Sbjct	3988	GTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT	3929
SI	bjct	4828	TTGTAAAGCACTTI	TGTCCGGAAAGAAATCCTCTC	GGTTAATACCCCGGGG	GGATGACGG	4769	Query	1321	GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT	1380
Q	uery	481	TACCGGAAGAATAA	AGCACCGGCTAACTACGTGCCA	AGCAGCCGCGGTAATAC	GTAGGGTGC	540	Sbjct	3928	GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCT	3869
SI	bjct	4768	TACCGGAAGAATAA	AGCACCGGCTAACTACGTGCCA	AGCAGCCGCGGTAATAC	GTAGGGTGC	4709	Query	1381	TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTAACCG	1440
Q	uery	541	GAGCGTTAATCGGA	ATTACTGGGCGTAAAGCGTG	GCAGGCGGTGATGCAA	GACCGATGT	600	Sbjct	3868	TGTACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTAACCG	3809
SI	bjct	4708	GAGCGTTAATCGGA	ATTACTGGGCGTAAAGCGTG	GCAGGCGGTGATGCAA	GACCGATGT	4649	Query	1441	CAAGGAGGACGGTCACCACGGCAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	1500
Qı	uery	601	GAAATCCCCGGGCT	TAACCTGGGAACTGCATTGG	GACTGCATCGCTGGAG	TATGGCAGA	660	Sbjct	3808	CAAGGAGGACGGTCACCACGGCAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	3749
SI	bjct	4648	GAAATCCCCGGGC1	TAACCTGGGAACTGCATTGG	I GACTGCATCGCTGGAG	TATGGCAGA	4589	Query	1501	GTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCA 1534	
0	uery	661	GGGGGGGTAGAATTO	CACGTGTAGCAGTGAAATGC	TAGAGATGTGGAGGAA	TACCGATGG	720	Sbjct	3748	GTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCA 3715	
		_					_	1			

ANEXO 4 - Genomas de estirpes referência utilizadas para análises genômicas comparativas com estirpes isoladas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

Genoma	accession	assembly	Scaffolds	contigs	N50	L50	GC (%)	assemble level	host	country
<i>P. nodosa</i> DSM 21604	NZ_JAFA00000000.1	GCF_000519185.1	113	130	195.270	15	64,10	scaffold	Mimosa scabrella	Brazil
<i>P. nodosa</i> CNPSo 1341	NZ_MCNV00000000.1	GCA_001718195.1	86	86	290.154	10	64,2	contig	Phaseolus vulgaris	Brazil
P. guartelaensi s CNPSo 3008	NZ_XMOD00000000.1	GCA_004353905.1	173	173	172.576	16	63,7	contig	Mimosa gymnas	Brazil
<i>P. silvatlan- tica</i> SRMrh- 85	NZ_JACHVZ0000000 00.1	GCA_014191065.1	54	56	335.938	10	64,4	scaffold	Mize, rhi- zosphere	Brazil
P. phytofir- mans PsJN	NC_010681.1 NC_010676.1 NC_010679.1	GCA_000020125.1	3	3	4.467.53 7	1	62,3	complete genome	Glomus vesicu- liferum	Canada
P. dipogonis ICMP 19430	NZ_SNVI0000000.1	GCA_004402975.1	8	8	3.862.78 1	2	61,1	contig	Dipogon lignosus	New Zealand
<i>P. tuberum</i> DUS833	NZ_FNKX00000000.1	GCA_900101795.1	5	5	2.956.71 2	2	63,0	contig	Lebeckia ambigua	South Africa
<i>P. sprentiae</i> WSM5005	NZ_AXBN0000000.1	GCA_000473465.1	8	96	117.489	10	63,2	scaffold	Lebeckia ambigua	South Africa
<i>P. monticola</i> JC 2948	NZ_LRBG00000000.1	GCA_001580545.1	39	39	507,365	6	63,8	contig	Mountain soil	South Korea

FONTE: banco de dados do NCBI - RefSeq (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/) (2022).

ANEXO 5 – Crescimento¹ em diferentes fontes de carbono de estirpes selecionadas a partir de nódulos de *Mimosa* spp.

-	Para	burkholderia	P. spC	P. spD	
Fonte de Carbono	9.2	6.3	6.1	10.7	88.12
Water	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
a-Cyclodextrin	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Dextrin	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3
i-Erythritol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Maltose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D-Melibiose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D-Raffinose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sucrose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Xylitol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
a-Ketovaleric Acid	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Thymidine	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Turanose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
D-Serine	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
B-Methyl-D-Glucoside	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Inosine	0,0	0,0	0,7	0,7	0,0
a-D-Glucose-1-Phosphate	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Uridine	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2,3-Butanediol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
y-Hydroxybutyric Acid	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
a-D-Lactose	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
D, L-Carnitine	0,1	0,4	0,0	0,0	0,0
a-Ketobutyric Acid	0,1	0,0	0,4	0,4	0,0
Phenylethylamine	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0

a-Hydroxybutyric Acid	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
Glycogen	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1
D-Psicose	0,2	0,3	0,4	0,4	0,0
D, L, a-Glycerol Phosphate	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Formic Acid	0,2	0,3	0,5	0,5	0,0
Acetic Acid	0,2	0,3	0,4	0,4	0,1
Lactulose	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0
	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1
D-Glucose-6-Phosphate	0,5	0,1	0,0	0,0	0,1
L-Alaninamide	0,5	0,4	0,4	0,4	0,0
Proprionic Acid	0,5	0,4	0,6	0,6	0,0
NIAIONIC ACIO	0,0	0,1	0,5	0,5	0,0
BIOINOSUCCINIC ACIO	0,0	0,3	0,0	0,5	0,1
	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,7	0,4	0,0	0,0	0,4
	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
	1 1	0,3	0,0	0,0	0,5
Succinic Acid Mono-Methyl Ester	1.1	0,4	0,0	0,0	0,0
D L L actic Acid	1.2	0,2	0,5	0,5	0,2
D-Galactonic Acid Lactone	1.2	0,0	0,0	0,0	0,0
	1.2	0.3	0.5	0.5	0.1
L-Serine	1.2	0.5	0.6	0.6	0.0
Urocanic Acid	1.3	0.4	0.3	0.3	0.2
p-Hydroxyphenlyacetic Acid	1.3	0.2	0.4	0.4	0.1
a-Ketoglutaric Acid	1.3	0.6	0.0	0.0	0.0
D-Alanine	1,3	0,5	0,5	0,5	0,1
L-Histidine	1,3	0,6	0,2	0,2	0,0
L-Threonine	1,3	0,4	0,6	0,6	0,1
Sebacic Acid	1,4	0,4	0,7	0,7	0,3
L-Leucine	1,4	1,1	0,5	0,5	0,0
Pyruvic Acid Methyl Ester	1,4	0,5	0,8	0,8	0,7
Glucuronamide	1,4	0,0	0,8	0,8	0,1
Citric Acid	1,4	0,6	0,0	0,0	0,0
Cis-Aconitic Acid	1,5	0,5	0,7	0,7	0,2
Tween 80	1,5	0,3	0,5	0,5	0,2
Glycyl-L-Aspartic Acid	1,5	0,1	0,0	0,0	0,0
D-Glucosaminic Acid	1,5	0,6	1,0	1,0	0,5
D-Sorbitol	1,6	0,5	1,0	1,0	0,2
Tween 40	1,6	0,2	0,4	0,4	0,5
B-Hydroxybutyric Acid	1,7	0,6	0,9	0,9	0,3
L-Alanine	1,7	0,5	0,8	0,8	0,1
N-Acetyl-D-Glucosamine	1,7	0,6	1,0	1,0	0,7
N-Aceyl-D-Galactosamine	1,8	0,0	0,2	0,2	0,0
Glycerol	1,8	0,0	0,6	0,6	0,1
2-Aminoethanol	1,9	0,1	0,5	0,5	0,0
Hydroxy-L-Proline	2,0	0,5	0,4	0,4	0,0
	2,0	0,4	0,5	0,5	0,1
	2,0	0,4	0,5	0,5	0,1
	2,0	0,0	1,0	1,0	0,4
Gontiobiogo	2,0	0,3	0,0	0,0	0,0
	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0
D-Glucuronic Acid	2,1	0,4	1.0	1.0	0.4
D-Saccharic Acid	2.2	0,0	1,0	1.0	0.3
	2.2	0.5	0.8	0.8	0.2
I -Rhampose	2.2	0.5	1 1	11	0.4
I -Aspartic Acid	2.2	0.6	0.5	0.5	0.4
	-,-	0,0	0,0	0,0	0,1

y-Aminobutyric Acid	2,2	0,3	0,6	0,6	0,0
L-Arabinose	2,3	0,4	0,5	0,5	0,2
Quinic Acid	2,4	0,3	1,1	1,1	0,3
D-Arabitol	2,5	0,5	0,9	0,9	0,2
Adonitol	2,6	0,6	0,9	0,9	0,3
L-Glutamic Acid	2,7	0,6	0,5	0,5	0,4
D-Trehalose	2,7	0,5	0,0	0,0	0,0
D-Mannose	2,7	0,6	0,0	0,0	0,0
D-Gluconic Acid	2,8	0,6	1,0	1,0	0,6
D-Galacturonic Acid	2,8	0,6	1,0	1,0	0,0
D-Galactose	2,8	0,5	1,1	1,1	0,0
L-Ptoline	2,8	0,8	0,6	0,6	0,1
D-Cellobiose	2,9	0,4	0,0	0,0	0,1
L-Asparige	3,0	0,6	0,8	0,8	0,4
a-D-Glucose	3,3	0,6	1,1	1,1	0,1

¹Demonstrados os resultados de D.O.⁵⁹⁵ após incubação das estirpes por 48h. Em vermelho, D.O. menores que 0,1 ou indetectáveis (sem crescimento); em amarelo, D.O. entre 0,1 e 1,0, apontando baixo ou crescimento lento; em verde, D.O. entre 1,0 e 2,0 indicando boa assimilação da fonte de carbono; em azul, D.O. maiores que 2,0 indicando as fontes de carbono mais bem assimiladas no período de teste.

FONTE: o próprio estudo (2022).

ANEXO 6 – Genes responsáveis pela motilidade flagelar identificados¹ nos genomas de *Paraburkholderia* spA, *P.* spD e *P.* spC.

Organism 🛓 🔻	Domain Bact 🗸	Variant	active	FlaAB	FlhA	FlhB	FliI	FliR	FlgD	FlgH	MotA	MotB	FliM	FliN	FleN	FlhF	CheA	CheV	CheY	FliA	RpoN
		= 🗸	<u>,,,,</u>																		
<u>BN5.1 Unknown sp.</u> (6666666.592982)	Bacteria	2	yes		<mark>6187</mark> , <u>6827</u>	<mark>6186</mark> , <u>6826</u>	<u>6218</u> , 6839	5208, <u>6825</u>	<mark>6198</mark> , <u>6842</u>	<u>6202</u> , <u>6831</u>	<u>6173</u>	6174	6213	<u>6212</u> , 6845	6189	6188	<u>8410</u>	<u>11028</u>		6190	4142, 4721, 5599, 8367
<u>Burkholderia sp.</u> <u>(66666666.503135)</u>	Bacteria	2	yes		7303	7302	<u>8984</u>	<u>8993</u>	9004	9000	6064, 7289	6063, 6489, 7290	<u>8988</u>	<u>8989</u>	9012	9013	<u>3938</u> , <u>3939</u>	<u>4482</u> , <u>6683</u>		9011	2475, 2715, 5112, 5511, 8768, 8768, 8769
<u>89.3 Unknown sp.</u> <u>(66666666.592979)</u>	Bacteria	2	yes		2732	2731	<u>2762</u>	<u>2753</u>	2743	2747	<u>2715</u>	2716	2758	2757	2734	2733		<u>7195</u>		2735	302, 6030, 6717, 7267, 8196
<u>88.12 Unknown sp.</u> (<u>66666666.651551)</u>	Bacteria	2	yes		6096	<u>3144</u> , 6095	<u>8107</u>	<u>6117</u>	<u>6107</u>	<u>6111</u>	<u>6079</u>	<u>6080</u>	<u>6122</u>	<u>6121</u>	6098	<u>6097</u>		<u>5633</u>		6099	4801, 482, 6622, 6939
<u>Burkholderia sp.</u> (66666666.503138)	Bacteria	2	yes		7425	7424	3609	<u>1846</u>	1835	1839	7410, 859	<u>42</u> , 7411, 858	<u>1851</u>	<u>1850</u>	1828	1827	3626	<u>3629</u> , <u>8449</u>		1829	1511, 1516, 1517, 3110, 4174, 5598, 608
<u>MP1.1 Unknown sp.</u> <u>(66666666.592994)</u>	Bacteria	2	yes		4050	4051	<u>8727</u>	<u>8718</u>	8708	<u>3712</u>	<u>4065</u> , <u>651</u> , <u>7055</u>	4064, 652, 7056, 7057	8723	8722	8701	8700	<u>5848</u>	7196		8702	1586, 1859, 4248, 4321, 819
<u>Unknown</u> Paraburkholderia sp. 10.7 (6666666.898080)	Bacteria	2	yes		1124	1125	<u>1093</u>	1102	1112	1108	1139, <mark>2663</mark> , <u>6612</u>	1138, 2664, 6613	<u>1097</u>	<u>1098</u>	<u>1121</u>	1122		<u>1649</u>		1120	<u>404,</u> 7190, 8428, 952

¹ A identificação dos genes ocorreu por meio da submissão dos genomas na plataforma RAST (<u>https://rast.nmpdr.org</u>).

FONTE: o próprio estudo (2022).

Características	1	2* ^a	3 ^b	4 ^c
Fonte de isolamento	Mimosa	Mimosa	Mimosa	Rizosfera de
Crescimento a/em/com	murex	gymnas	scaprella	cereais
1% NaCl	+	+	f	eb
37 °C	+	-	-	4
Perfil lipídico (% relativa)	•	_	_	•
	34 0	41 2	da	28.8
C17:0	23	18.0	da	14 1
C19:0	26.7	14.3	da	9.4
Carboidratos	2011	11.0	du	0.1
Glicerol	+	f	f	+
Eritritol	-	f	-	+
L-Arabinose	+	+	f	+
D-Adonitol	+	+	f	+
D-Galactose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Frutose	+	+	f	+
D-Manose	+	+	+	+
L-Ramnose	+	+	+	+
D-Manitol	+	+	f	+
D-Sorbitol	+	+	f	+
N-Acetilglucosamina	+	-	-	+
D-Celobiose	+	f	f	+
D-Maltose	-	-	-	-
D-Lactose	f	f	f	-
D-Melibiose	-	-	-	-
D-Sacarose	+	f	+	+
D-Trealose	+	+	f	-
D-Rafinose	-	-	f	-
Glicogênio	f	f	f	-
Gentiobiose	+	f	+	-
D-Turanose	f	-	-	+
L-Fucose	+	+	f	+
D-Arabitol	+	f	f	+
L-Arabitol	-	f	f	-
Nodulação em				
M. pudica	+	+	+	-
Conteúdo G + C (mol%)	63.4	63.7	62.8	64.5
Tamanho do Genoma (Mb)	9.1	9.5	9.0	8.09

ANEXO 7 – Comparações fenotípicas entre *Paraburkholderia spA* e estirpes tipo próximas do gênero *Paraburkholderia*¹.

¹ Os dados foram retirados do próprio estudo e da literatura, quando indicado. **(1)** *P. sp9.2*, **(2)** *P. guartelaensis* CNPS0 3008^T, **(3)** *P. nodosa* BR3437^T, **(4)** *P. silvatlantica* LMG 23149^T. Crescimento (+); sem crescimento (-); fraco crescimento (f); dados ausentes (da).

*Dados retirados de: *a*, PAULITSCH et al. 2019; *b*, CHEN et al. (2007); *c*, PERIN et al. (2006).

FONTE: o próprio estudo.

Características	1	2* ^a	3 ^b	4°
Fonte de isolamento	Mimosa sp.	Mimosa diplotricha	Lebeckia ambigua	Solo
Crescimento a/em/com				
1% NaCl	+	da	+	+
37 °C	+	+	+	+
pH 8	-	da	+	+
Perfil lipídico (% relativa)				
C _{16:0}	39.3	24.7	19.9	22.9
C _{17:0}	18.6	19.7	10.6	22.5
C _{19:0}	12.2	17.5	4.10	17.7
Carboidratos				
L-Arabinose	+	+	+	-
D-Glucose	+	+	+	+
D-Manose	f	-	+	-
D-Manitol	+	+	+	+
N-Acetilglucosamina	+	+	+	+
Nodulação em				
M. pudica	+	+	-	-
Conteúdo G + C (mol%)	64.02	62.8	63.9	63.78
Tamanho do Genoma (Mb)	7.09	8.98	3.65	7.85

ANEXO 8 – Comparações fenotípicas entre *Paraburkholderia spD* e estirpes tipo próximas do gênero *Paraburkholderia*¹.

¹ Os dados foram retirados do próprio estudo e da literatura, quando indicado. **(1)** *Paraburkholderia* spD, **(2)** *P. tuberum* ST678^T, **(3)** *P. sprentiae* WS5005^T, **(4)** *P. monticola* JC 2948^T. Crescimento (+); sem crescimento (-); fraco crescimento (f); dados ausentes (da).

*Dados retirados de: a, BEAK, et al. (2015); b, DE MEYER et al. (2013); c, VANDAMME, et al. (2002).

FONTE: o próprio estudo (2022).

ANEXO 9 – Comparações fenotípicas entre *Paraburkholderia spC* e estirpes tipo próximas do gênero *Paraburkholderia*¹.

Características	1	2* ^a	3 ^b
Fonte de isolamento	Mimosa piscatorum	Raízes de cebola	Dipogon lignosus
Crescimento a/em/com			-
1% NaCl	+	+	+
37 °C	+	-	+
Perfil lipídico (% relativa)			
C _{16:0}	31.1	13.8	19.1
C _{18:0}	14.6	44.3	1.6
C _{19:0}	23.6	1.8	7.5
Carboidratos			
L-Arabinose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Manose	-	+	+
N-Acetilglucosamina	+	+	+
Nodulação em			
M. pudica	+	-	da
Conteúdo G + C (mol%)	61.9	61.0	61.6
Tamanho do Genoma (Mb)	8.8	8.2	10.2

¹ Os dados foram retirados do próprio estudo e da literatura, quando indicado. (1) *Paraburkholderia* spC, (2) *P. phytofirmans* PsJN^T, (3) *P. dipogonis* ICP 19430^T. Crescimento (+); sem crescimento (-); fraco crescimento (f); dados ausentes (da).

*Dados retirados de: a, SESSITSCH et al. (2005); b, SHEU et al. (2015).

FONTE: o próprio estudo (2022).