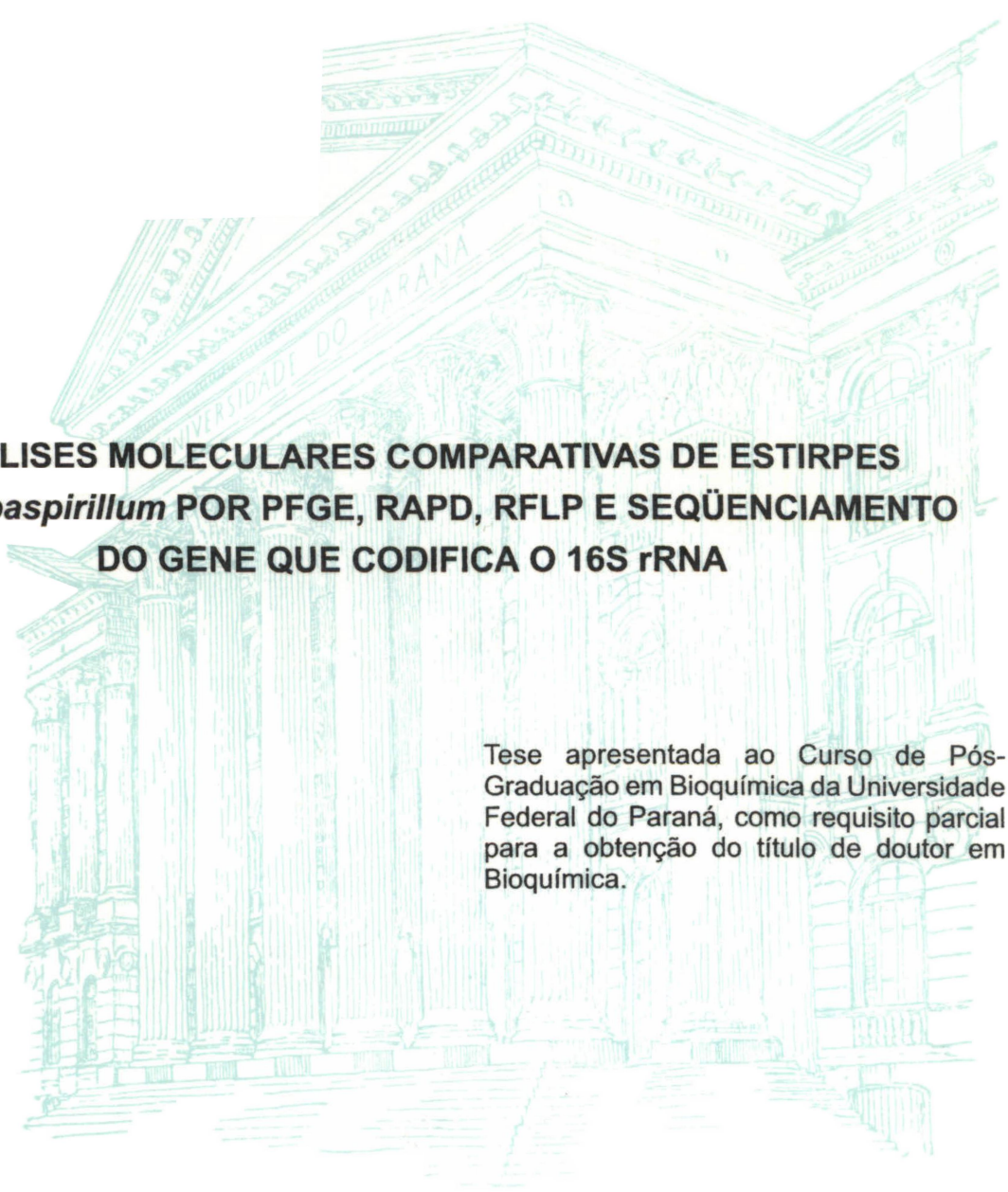


JULIANA ROCHA LOPES SOARES RAMOS



**ANÁLISES MOLECULARES COMPARATIVAS DE ESTIRPES  
DE *Herbaspirillum* POR PFGE, RAPD, RFLP E SEQÜENCIAMENTO  
DO GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.

CURITIBA

2003

JULIANA ROCHA LOPES SOARES RAMOS

**ANÁLISES MOLECULARES COMPARATIVAS DE ESTIRPES  
DE *Herbaspirillum* POR PFGE, RAPD, RFLP E SEQÜENCIAMENTO  
DO GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.

CURITIBA

2003

**JULIANA ROCHA LOPES SOARES RAMOS**

**ANÁLISES MOLECULARES COMPARATIVAS DE  
ESTIRPES DE *Herbaspirillum* POR PFGE, RAPD, RFLP E  
SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA**

**Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica) no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:**



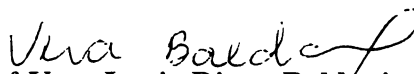
**Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Orientador)**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**UFPR**



**Profª Drª Elaine Machado Benelli**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**UFPR**



**Profª Drª Maria Luiza Petzl Erler**  
**Departamento de Genética**  
**UFPR**



**Drª Vera Lucia Divan Baldani**  
**EMBRAPA, RJ**



**Profª Drª Elza Fernandes de Araujo**  
**Departamento de Microbiologia**  
**UFV**

**Curitiba, 30 de julho de 2003**

Orientadores:

Prof. Emanuel Maltempi de Souza

Prof. Leda Satie Chubatsu

A Deus.

Aos meus pais, Fernando e Violeta e ao meu irmão, Fernando.

A minha família Viçosense.

Aos meus Humberto e Dudinha.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Fábio, pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio e por sempre ser solícito, em todos os aspectos, tanto comigo quanto com o Humberto. Muito obrigada!

Aos meus orientadores, Prof. Emanuel e Prof. Leda pelas sugestões, pelo auxílio na elaboração deste trabalho e pela paciência. Muito obrigada!

Aos professores, pelos conhecimentos adquiridos ao longo destes anos. Muito obrigada!

Ao Dr. Marshal Geoffrey Yates pelas correções sempre muito cuidadosas dos textos em inglês. Hy Geff, thank you!!

As Professoras Cinthia Pichet e Elaine Benelli pelas sugestões e dedicação, sempre dispostas a ajudar no que for preciso. Muito obrigada!

A todos os funcionários, e em especial a D. Marilza, Nancy, D. Ju, D. Roseli Prado e ao Valter. Muito obrigada por todo auxílio técnico e pelos momentos de descontração. Nunca vou me esquecer de vocês.

A todos os colegas do departamento, mesmo aos que não colaboraram diretamente na execução deste trabalho, mas sempre deram uma forcinha nos bate papos pelos corredores, muito obrigada!

A todos os meus amigos, aos que já passaram pelo departamento, e aos que ainda continuam, muito obrigada pelo ombro amigo nos momentos difíceis e, principalmente pelas festas e alegrias compartilhadas. Afinal de contas, viver também é preciso! Valeu mesmo galera, muito obrigada!!!

A minha "família Viçosense", por todo apoio, amizade e companheirismo em todos os momentos. Muito obrigada.

Aos meus pais Maria Violeta e Fernando Lopes, por tudo de bom que eles são e sempre foram na minha vida. Por toda a ajuda, de todos os modos, nos bons e maus momentos e por tentarem compreenderem como funciona a pós-graduação. Muito obrigada de coração!!!

Aos meus Humberto e Dudinha. Ao Humberto por todo amor, dedicação e contribuição para a realização deste trabalho, além da força e amizade sempre. À minha Dudinha, que representa a luz da minha vida e minha alegria maior. Muito obrigada por vocês existirem e fazerem parte da minha vida!!!

A Deus por tudo.

## SUMÁRIO

	<b>AGRADECIMENTOS</b>	IV
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	VIII
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	X
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	XI
	<b>RESUMO</b>	XII
	<b>ABSTRACT</b>	XIII
1 -	<b>INTRODUÇÃO:</b>	1
1.1 -	Fixação de Nitrogênio	1
1.2 -	Organismos Diazotróficos	2
1.3 -	O Gênero <i>Herbaspirillum</i>	4
1.4 -	Diversidade Genética em Microrganismos	8
1.5 -	Métodos Moleculares para a Identificação e Classificação Bacteriana	10
1.5.1 -	Eletroforese em Campo Pulsado	12
1.5.2 -	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de DNA por Restrição - RFLP	15
1.5.3 -	O Gene que Codifica o rRNA 16S	16
1.5.4 -	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso - RAPD	19
2 -	<b>OBJETIVOS</b>	21
3 -	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
3.1 -	Bactérias	22
3.2 -	Meios de Cultura	22
	Meio NFb-malato	23
	Solução de micronutrientes para meio de cultura	23
	Solução de fosfatos para <i>Herbaspirillum</i>	23
3.3 -	Condições de Crescimento dos Microrganismos	24
3.4 -	Reagentes Químicos	24
3.5 -	Enzimas de Restrição	25
3.6 -	Preparo de DNA Genômico	25
3.7 -	Condições de Restrição do DNA Aprisionado em Agarose	26
3.8 -	Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	27
3.9 -	Transferência de DNA do Gel de Agarose Para Membrana de Náilon	27
3.10 -	Obtenção, Purificação e Marcação das Sondas	28
3.11 -	Hibridização de DNA Genômico de <i>Herbaspirillum</i>	30
3.12 -	Purificação de DNA Genômico	30

3.13 -	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de DNA por Restrição - RFLP	31
3.14 -	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso - RAPD	32
3.15 -	Amplificação do Gene que Codifica o 16S rRNA por PCR	32
3.16 -	Sequenciamento do Gene que Codifica o 16S rRNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i>	33
3.17 -	Programas Utilizados Para Análise de DNA	34
4 -	<b>RESULTADOS</b>	36
4.1 -	Geometria e Tamanho do Genoma de <i>H. seropedicae</i> Z78 por PFGE	36
4.2 -	Perfil de Restrição do DNA Genômico de <i>H. seropedicae</i> Estirpe Z78 com Enzimas de Sítios Raros e Hibridização com Gene que Codifica o rRNA 16S	38
4.3 -	Perfil de Restrição com Enzimas de Corte Raro das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> e Hibridização com Gene que Codifica o rRNA 16S	43
4.4 -	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de DNA por Restrição - RFLP	50
4.5 -	Perfil de Restrição de Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com Diferentes Endonucleases de Restrição e Hibridização com Gene que Codifica o 16S rRNA	57
4.6 -	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso - RAPD	61
4.7 -	Sequenciamento do Gene que Codifica o 16S rRNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i>	70
5 -	<b>DISCUSSÃO</b>	74
6 -	<b>CONCLUSÕES</b>	82
7 -	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	83
	<b>APÊNDICE 1</b>	106

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil de Migração do DNA Intacto de <i>H. seropedicae</i> Z78 em Eletroforese em Campo Pulsado	37
Figura 2 - Perfil de Migração do DNA Genômico de <i>H. seropedicae</i> Z78 Parcialmente Clivado Submetido a Eletroforese em Campo Pulsado	39
Figura 3 - Perfil de Migração dos Fragmentos de DNA Genômico de Baixa Massa Molecular de <i>H. seropedicae</i> Z78 em Eletroforese em Campo Pulsado	40
Figura 4 - Perfil de Migração dos Fragmentos de DNA Genômico de Baixa Massa Molecular de <i>H. seropedicae</i> Z78 em Eletroforese em Campo Pulsado	41
Figura 5 - Perfil de Migração dos Fragmentos de DNA Genômico de Média Massa Molecular de <i>H. seropedicae</i> Z78 em Eletroforese em Campo Pulsado	42
Figura 6 - Perfil de Hibridização do DNA Genômico de <i>H. seropedicae</i> Z78 com uma Sonda Contendo o Gene que Codifica o 16S rRNA de <i>H. seropedicae</i> Z78	45
Figura 7 - Perfil de Migração do DNA Genômico Intacto das Estirpes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> em Eletroforese em Campo Pulsado	46
Figura 8 - DNA Genômico das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Digerido com <i>SwaI</i> e Hibridizado com o Gene que Codifica o 16S rRNA de <i>H. seropedicae</i> Z78.	48
Figura 9 - Esquema de Bandeamento da Eletroforese em Campo Pulsado do DNA Genômico Digerido com <i>SwaI</i> das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Utilizado para Construção do Dendrograma	52
Figura 10 - Dendrograma das Sete Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Construído a partir do Perfil de Migração do DNA Genômico Digerido com a Endonuclease <i>SwaI</i> , por Eletroforese em Campo Pulsado	53
Figura 11 - Perfil de Migração dos Fragmentos de DNA Genômico Digerido com a Endonuclease <i>HindIII</i> das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> .	54
Figura 12 - Perfil de Migração dos Fragmentos de DNA Genômico Digerido com a Endonuclease <i>DraI</i> das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> .	55
Figura 13 - Dendrograma das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Construído a partir do Perfil Obtido por RFLP pela Digestão do DNA Genômico com Endonucleases <i>HindIII</i> e <i>DraI</i>	56
Figura 14 - Perfil de Hibridização do DNA Genômico das Diferentes Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Digerido com <i>HindIII</i> e Hibridizado com o Gene que Codifica o 16S	

	rRNA	58
Figura 15 -	Perfil de Hibridização do DNA Genômico das Diferentes Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Digerido com <i>EcoRI</i> e Hibridizado com o Gene que Codifica o 16S rRNA	59
Figura 16 -	Perfil de Hibridização do DNA Genômico das Diferentes Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Digerido com <i>DraI</i> e Hibridizado com o Gene que Codifica o 16S rRNA	60
Figura 17 -	Perfil de Amplificação ao Acaso de DNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com o Iniciador 1	62
Figura 18 -	Perfil de Amplificação ao Acaso de DNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com o Iniciador 2	63
Figura 19 -	Perfil de Amplificação ao Acaso de DNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com o Iniciador 3	64
Figura 20 -	Perfil de Amplificação ao Acaso de DNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com o Iniciador 4	65
Figura 21 -	Perfil de Amplificação ao Acaso de DNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com o Iniciador 5	66
Figura 22 -	Perfil de Amplificação ao Acaso de DNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com o Iniciador 6	67
Figura 23 -	Dendrograma das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Construído a partir do Perfil Obtido por RAPD com Seis Iniciadores	68
Figura 24 -	Árvore Filogenética Construída a partir das Seqüências do Gene que Codifica o 16S rRNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Obtidas Neste Trabalho (*) ou Disponíveis no Banco de Dados GenBank	71

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Lista de Estirpes	22
Tabela 2 -	Enzimas de Restrição Utilizadas	25
Tabela 3 -	Seqüências dos Iniciadores Utilizados para Amplificação de DNA ao Acaso	32
Tabela 4 -	Iniciadores Utilizados para Amplificação e Sequenciamento do Gene que Codifica o 16S rRNA das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i>	34
Tabela 5 -	Fragmentos de Restrição do DNA Genômico de <i>H. seropedicae</i> Z78 Obtidos pela Digestão com Endonucleases de Restrição de Corte Raro <i>SwaI</i> e <i>PacI</i>	44
Tabela 6 -	Fragmentos de DNA Gerados pela Digestão do DNA Genômico das Diferentes Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> com Enzima <i>SwaI</i>	49
Tabela 7 -	Caracterização Genotípica das Estirpes de <i>Herbaspirillum</i> Obtidas por Perfis de PFGE, RAPD e RFLP, e Análise das Seqüências Parciais do Gene que Codifica o rRNA 16S	69
Tabela 8 -	Matriz de Proporção de Identidade entre Pares de Seqüências do Gene que Codifica o 16S rRNA Calculada a Partir do Alinhamento entre as Seqüências das Estirpes Analisadas	73

**LISTA DE ABREVIATURAS**

atm -	Atmosfera
dATP -	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP -	Deoxicitidina trifosfato
dGTP -	Deoxiguanosina trifosfato
dTTP -	Deoxitimidina trifosfato
DNA -	Ácido desoxiribonucléico
EDTA -	Ácido etileno diamino tetra-acético
Kb -	kilo bases ( $10^3$ pb)
Mb -	Mega bases ( $10^6$ pb)
min -	Minuto
MM -	Massa Molecular
pb -	Pares de bases
PFGE -	Eletroforese em Campo Pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
PMSF -	Fenil Metilsulfonilfluoreto
PCR -	Reação da polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction)
q.s.p -	Quantidade suficiente para
RAPD -	Amplificação de DNA ao Acaso (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP -	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA -	Ácido Ribonucléico
SDS -	Dodecil sulfato de sódio

## RESUMO

*Herbaspirillum* são organismos diazotróficos endofíticos associados a importantes gramíneas. A análise por eletroforese em campo pulsado do DNA genômico da estirpe Z78 de *H. seropedicae* indicou a presença um único cromossoma com tamanho de aproximadamente 5700 Kb. Neste trabalho foram ainda conduzidas análise comparativa das estirpes Z78, M2, ZA69, ZA95, Z152 e Z67 de *H. seropedicae* e a estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans* por eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição com endonucleases *HindIII* ou *DraI* (RFLP), polimorfismo de amplificação aleatória (RAPD), e sequenciamento parcial do Gene que Codifica o rRNA 16S. Os resultados obtidos com PFGE mostraram que todas as estirpes de *Herbaspirillum* analisadas possuem genoma circular com tamanho variando de 5302 Kb para a estirpe ZA69 a 5783 Kb para as estirpes M2 e M4. Diferentes perfis de PFGE foram obtidos quando a enzima *SwaI* foi utilizada para produzir macro fragmentos de restrição. Os resultados das análises dos quatro métodos utilizados permitiram a construção de dendrogramas de similaridade consistentes, agrupando as linhagens estudadas em três grupos distintos: grupo I inclui M2 e M4; grupo II, ZA69; e grupo III, ZA95, Z78, Z67, e Z152. O padrão de bandas resultante da amplificação aleatória (RAPD) do DNA genômico das várias estirpes apresentou um maior nível de variabilidade do que o obtido com os outros métodos: cada estirpe apresentou um único perfil eletroforético com cinco dos seis iniciadores utilizados. A estirpe M2 de *H. seropedicae* foi posicionada geneticamente muito próxima à estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans* em todas as análises realizadas neste estudo. Os resultados obtidos por experimentos de hibridização sugeriram que as estirpes Z78, Z67, Z152 e ZA95 de *H. Seropedicae*, possuem 5 cópias do Gene que Codifica o rRNA 16S e que as estirpes M2 e ZA69 de *H. seropedicae* e M4 de *H. rubrisubalbicans* possuem 4 cópias deste gene.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum* are endophytic diazotrophs associated with important agricultural crops. *H. seropedicae* strain Z78 was analysed by pulsed field gel electrophoresis, suggesting that its genome consists of one circular DNA molecule of approximately 5700 Kb. In this work we also compared six strains of *H. seropedicae* (Z78, M2, ZA69, ZA95, Z152 and Z67), and one strain of *H. rubrisubalbicans* (M4) using pulsed field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP) using *Hind*III or *Dra*I restriction endonucleases, random amplified polymorphic DNA (RAPD), and partial sequence of 16S rRNA. All *Herbaspirillum* strains had circular chromosomes and their sizes varied from 5302Kb for strain ZA69 to 5783Kb for strains M2 e M4. Different PFGE profiles were obtained when the rare restriction endonuclease *Swa*I was used to produce macrorestriction fragments. The analyses by the three methods produced consistent dendrograms of similarity allocating the strains studied in three distinct groups: group I consists of M2 and M4; group II, ZA69; and group III, ZA95, Z78, Z67 and Z152. The RAPD fingerprinting showed the highest variability, and each strain had a unique electrophoretic pattern with 5 of 6 primers used. *H. seropedicae* M2 was found genetically very close to *H. rubrisubalbicans* M4 by all analyses. Hybridization experiments showed that the *H. seropedicae* strains Z78, Z67, Z152 and ZA95 have 5 copies of the 16S rRNA gene and *H. seropedicae* strains M2 and ZA69, and *H. rubrisubalbicans* M4 have 4 copies of this gene.

## **1 – INTRODUÇÃO**

### **1.1 – FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO**

Fixação de nitrogênio é o processo químico ou biológico pelo qual o dinitrogênio gasoso ( $N_2$ ) é reduzido à amônia ( $NH_3$ ). A síntese química de amônia é utilizada principalmente para a produção de fertilizantes nitrogenados para a agricultura. Este processo apresenta custo elevado devido a necessidade de condições especiais, como pressão de aproximadamente 200 atmosferas e temperaturas entre 400 e 600°C (BOTHE *et al.*, 1983). Cerca de 65% do nitrogênio fixado na Terra é proveniente da fixação biológica, 25% são produzidos industrialmente e 10% são resultantes da ação de descargas elétricas, radiação ultravioleta, ação vulcânica, entre outros (NEWTON, 1999). A fixação biológica é importante na manutenção do ciclo do nitrogênio na biosfera, sendo também responsável pela disponibilização deste elemento para utilização pelos seres vivos (BURNS & HARDY, 1975; POSTGATE, 1982; NEWTON, 1999).

A fixação biológica de nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase que é encontrado apenas em organismos procariontes denominados diazotróficos. Estes organismos podem ser encontrados nos Reinos Bacteria, incluindo actinomicetos, cianobactérias, clostrídios e proteobactérias, e Archaea (POSTGATE, 1982). Nenhum eucarioto é capaz de utilizar o  $N_2$  diretamente em processos biossintéticos. Apesar disso, estes organismos podem utilizar nitrogênio biologicamente fixado resultante de uma associação íntima com procariontes diazotróficos (XIA *et al.*, 1994).

## 1.2 – ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

A capacidade de fixar nitrogênio é amplamente distribuída no Reino Bacteria e em alguns grupos de Archaea. Dentro destes reinos, a fixação de nitrogênio tem sido relatada em cerca de 100 gêneros distribuídos na maioria das principais divisões filogenéticas, embora quase todos estes gêneros também apresentem organismos que não são capazes de fixar nitrogênio (YOUNG, 1992).

A fixação de nitrogênio não é parâmetro para inclusão ou não de microrganismos em determinados grupos, uma vez que não existe uma divisão que inclua somente bactérias diazotróficas (YOUNG, 1992). Por esta razão, a classificação de organismos fixadores de nitrogênio precisa abranger a classificação bacteriana em geral, levando em conta aspectos ecológicos, fisiológicos e evolutivos (YOUNG, 1992).

Os organismos diazotróficos podem ser aeróbicos, anaeróbicos facultativos ou estritos, de vida livre, aquáticos ou do solo (YOUNG, 1992). Muitos organismos diazotróficos associam-se a plantas, colonizando o seu interior ou a rizosfera. Neste grupo encontram-se os rizóbios que associam-se simbioticamente com plantas leguminosas, culminando na formação de estruturas denominadas nódulos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). Outro grupo distinto é formado pelos actinomicetos do gênero *Frankia*, que formam simbiose com algumas Angiospermas (BERRY *et al*, 1993).

O termo organismo diazotrófico endofítico foi introduzido na área de fixação biológica de nitrogênio por DÖBEREINER (1992), embora o termo endofítico tenha sido criado em 1846 por Leveille, para definir um grupo especial de fungos que colonizavam o interior de tecidos de plantas. Este conceito foi ampliado por Chanway em 1996 (citado por BALDANI *et al.*, 1999), que observou colonização do

interior de tecidos de plantas por bactérias, sem causar sintoma de doença.

Os organismos endofíticos associam-se intimamente com seus hospedeiros, entretanto não desenvolvem estruturas especializadas, como os nódulos ou micorrizas. Este fato dificultou o isolamento e caracterização destes organismos associativos não simbióticos. Na década de 50 *Beijerinckia fluminensis* foi isolada da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958), o que resultou no início dos estudos da fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas. Deste então, novas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, pertencentes aos gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* foram isoladas com a utilização de meios de cultura semi-sólidos (DÖBEREINER *et al.*, 1995). Estes meios proporcionam um ambiente microaeróbio, onde a tensão de oxigênio não inibe a atividade da enzima nitrogenase, permitindo o isolamento de vários organismos diazotróficos endofíticos (KIRCHHOF *et al.*, 1997). Esses estudos demonstraram a amplitude da associação biológica entre organismos diazotróficos e plantas hospedeiras, principalmente gramíneas de interesse agrícola.

Os organismos diazotróficos endofíticos possuem vantagens quando comparados àqueles que colonizam superfícies das plantas, uma vez que sua localização facilita a captação de fontes de carbono produzidas pelas plantas e este ambiente também proporciona condições necessárias para a expressão e atividade da nitrogenase (VERMA *et al.*, 2001). Esta associação também pode trazer vantagens para a planta como, por exemplo, biocontrole de patógenos, estímulo do crescimento por produção de hormônios, resistência a doenças por indução de resistência sistêmica e localizada, e fixação de nitrogênio atmosférico e fornecimento de parte do nitrogênio fixado para a

planta (KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992; FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993; BALDANI *et al.*, 1995; HALLMAN *et al.*, 1997).

### 1.3 – O GÊNERO *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* compreende bactérias gram-negativas, espiraladas, geralmente vibrióides, algumas vezes helicoidais e móveis em presença de O<sub>2</sub> (BALDANI *et al.*, 1986). As células podem apresentar de 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos. O diâmetro destas bactérias foi estimado entre 0,6 e 0,7 µm e o comprimento celular pode variar entre 1,5 e 5,0 µm. Apresentam típico metabolismo aeróbio, não fermentam açúcares e fixam N<sub>2</sub> atmosférico sob condições de microaerofilia (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992). O gênero *Herbaspirillum*, que pertence à subdivisão beta das proteobactérias, apresenta cinco espécies descritas até o momento: *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001), *H. chlorophenolicum* (ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy) e *H. lusitanum* (ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy).

A inoculação de plantas com *Herbaspirillum* spp. pode resultar no aumento de crescimento e produtividade (BALDANI *et al.*, 1995). Estes efeitos são atribuídos a sua capacidade em fixar nitrogênio (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1991; URQUIAGA *et al.*, 1992; DÖBEREINER *et al.*, 1995; BODDEY *et al.*, 1995; OLIVARES *et al.*, 1996), e produção de auxinas e giberelinas, que podem induzir o crescimento da planta (BASTIÁN *et al.*, 1998).

A colonização da planta por estas bactérias inicia-se pela superfície das raízes e, em seguida, os microrganismos alcançam o interior da planta provavelmente através de pontos de ramificação de raízes secundárias ou por meio de rachaduras ou fendas presentes nas raízes, ocupando espaços intercelulares e o xilema (JAMES *et al.*,

1997; RONCATO-MACARI *et al.*, 2003). Ao contrário dos organismos diazotróficos que habitam a rizosfera e que necessitam competir com a microflora do solo por fontes de carbono, os organismos diazotróficos endofíticos como *Herbaspirillum* são encontrados no interior dos tecidos das plantas, ambientes mais uniformes e protegidos, o que pode explicar a alta contribuição da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar associada a *Herbaspirillum* (URQUIAGA *et al.*, 1992).

*H. seropedicae* foi primeiramente isolada no Brasil em 1986, por BALDANI e colaboradores, de preparações de rizosfera ou de raízes de milho, sorgo e arroz cultivados em diferentes solos. Posteriormente, foram encontradas colonizando raízes, colmos ou folhas de milho, sorgo, arroz, gramíneas forrageiras, palmeiras, abacaxizeiros e bananeiras, além de raízes e colmos de cana-de-açúcar. Existem poucos relatos quanto a ocorrência desta espécie em outros países, mas já foi isolada na Índia, Austrália e Alemanha (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1997; WEBER, 1998; CRUZ *et al.*, 2001). ELBELTAGY *et al.* (2001) relataram a presença de organismos diazotróficos endofíticos no Japão, isolados de arroz, que foram classificados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* com base em propriedades como utilização de fontes de carbono, comparações entre seqüências que codificam o gene 16S rRNA e hibridização com sondas gênero-específicas (HERB 86 e HERB 1432; KIRCHHOF *et al.*, 2001). Os autores afirmam que aquelas estirpes não se inserem nos grupos das espécies conhecidas, sugerindo que podem se tratar de uma nova espécie.

*H. rubrisubalbicans*, uma espécie fitopatogena originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, foi incluída no gênero *Herbaspirillum* com base em estudos moleculares (GILLIS *et al.*, 1990; BALDANI *et al.*, 1992, BALDANI *et al.*, 1996). Esta espécie foi detectada colonizando cana-de-açúcar, arroz, bananeira, abacaxizeiro

e palmeiras (BALDANI *et al.*, 1997; WEBER, 1998) causa a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar cultivada nos Estados Unidos e também estria vermelha em sorgo (James *et al.*, 1997). Nas plantas afetadas um grande número de *H. rubrisubalbicans* pode ser encontrado no interior dos tecidos das folhas, dentro dos vasos do protoxilema e associadas a lacunas, aparentemente bloqueando os vasos completamente (JAMES *et al.*, 1997). Não foi observada a doença em variedades desta gramínea plantadas comercialmente no Brasil (BALDANI *et al.*, 1996).

Tanto *H. seropedicae* quanto *H. rubrisubalbicans* aparentemente não sobrevivem em solos isentos de plantas (BALDANI *et al.*, 1996), embora a presença destes organismos em baixo número nestes solos tenha sido detectada (BALDANI *et al.*, 1996), e pode ter ocorrido devido à inclusão de pêlos radiculares ou pequenas frações de raízes nas amostras analisadas. OLIVARES *et al.* (1996) também sugerem que *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 pode permanecer no solo em um estado de latência, não podendo ser cultivada em laboratório. Entretanto, se este solo for usado para plantio de sementes esterilizadas, as bactérias são novamente encontradas na forma endofítica, cerca de 45 dias após o plantio. Presume-se que a planta produz substâncias capazes de induzir a proliferação bacteriana (OLIVARES *et al.*, 1996). O processo pelo qual estas bactérias são disseminadas ainda não foi totalmente desvendado, e uma das hipóteses indica que a disseminação ocorra por meio das sementes das plantas colonizadas (BALDANI *et al.*, 1997).

Recentemente, KIRCHROF *et al.* (2001) sugeriram a inclusão de uma nova espécie no gênero *Herbaspirillum*, denominada *H. frisingense*, baseado em propriedades fisiológicas, análises filogenéticas por comparação de seqüências do gene 16S rRNA e estudos de homologia DNA-DNA. Esta bactéria coloniza raízes de

gramíneas das espécies *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus* e *Pennisetum purpureum* crescidas no Brasil e Alemanha (HARTMANN *et al.*, 1999; KIRCHROF *et al.*, 2001).

*Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. são encontrados endofiticamente em cana-de-açúcar em número suficiente para fixar nitrogênio necessário para suprir as necessidades da planta (URQUIAGA *et al.*, 1992; DÖBEREINER *et al.*, 1993, 1994; JAMES *et al.*, 1994; DONG *et al.*, 1994; BODDEY, 1995). Entretanto, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* somente foi encontrado em cana-de-açúcar, não sendo detectada em sorgo nem arroz. Por esta razão, *Herbaspirillum* tem potencial para ser utilizado como biofertilizante em outras espécies de gramíneas (DÖBEREINER *et al.*, 1995; BODDEY, 1995; OLIVARES *et al.*, 1996, JAMES *et al.*, 1997).

As duas espécies de *Herbaspirillum* mais estudadas podem ser separadas por parâmetros fisiológicos e morfológicos: *H. seropedicae* é capaz de utilizar *N*-acetil-glucosamina como única fonte de carbono, mas não *meso*-erithritol, além de apresentar de um a três flagelos em um único pólo; estirpes de *H. rubrisubalbicans*, por outro lado, são capazes de crescer em *meso*-erithritol, mas não utilizam *N*-acetyl-glucosamina como única fonte de carbono, além de possuírem múltiplos flagelos em um pólo (BALDANI *et al.*, 1996). Finalmente, *H. rubrisubalbicans* é um colonizador de tecidos de plantas aparentemente mais agressivo que *H. seropedicae* (JAMES *et al.*, 1997). Poucas estirpes de espécies de *Herbaspirillum* foram analisadas ao nível molecular. A análise da seqüência parcial do gene 16S rRNA (cerca de 300 pb) não diferenciou claramente as estirpes pertencentes às espécies de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (CRUZ *et al.*, 2001). Por este motivo, estudos moleculares mais discriminatórios são necessários para a determinação de suas relações filogenéticas.

## 1.4 – DIVERSIDADE GENÉTICA EM MICRORGANISMOS

Estudos recentes mostraram uma plasticidade surpreendente na estrutura do genoma de muitas bactérias, apresentando variação mesmo entre estirpes de uma mesma espécie. A estrutura do DNA bacteriano pode ser analisada sob vários aspectos, como número de cromossomas, tamanho do genoma, geometria do replicon, conteúdo de G+C, seqüência e freqüência de nucleotídeos e organização dos genes (CASJENS, 1998). Com o desenvolvimento de metodologias capazes de permitir a análise de DNA de alta massa molecular, estimar o tamanho de cromossomas e construir mapas genômicos de vários microrganismos tornaram-se práticas amplamente utilizadas (LEE *et al.*, 1996; CASJENS, 1998; MORENO, 1998).

Grandes replicons são designados como cromossomas enquanto os menores são denominados elementos extra cromossômicos, plasmídeos, ou ainda, pequenos cromossomas (KOLSTO, 1997). Todavia, estas definições tornaram-se confusas à medida que novos paradigmas surgiram. São considerados cromossomas replicons que possuem genes essenciais para o organismo. Por outro lado, certos replicons podem não ser imprescindíveis em condições de laboratório, embora possam estar presentes em todos os isolados naturais de uma dada espécie, sugerindo que contém genes essenciais para sobrevivência no "habitat" natural destes organismos (CASJENS & HUANG, 1993; LEWIN, 1997; CASJENS, 1998).

Em relação ao número de cromossomas, a maioria das bactérias apresenta um único replicon, mas já foi relatado que membros de vários gêneros podem conter dois ou mais mega-replicons, como *Agrobacterium* (ALLARDET-SERVENT *et al.*, 1993; JUMAS-BILAK *et al.*, 1995), *Brucella* (MICHAUX *et al.*, 1993; JUMAS-BILAK *et al.*, 1995; JUMAS-BILAK *et al.*, 1998), *Rhizobium* (HONEYCUTT *et al.*, 1993), *Rhodobacter* (CHOUDHARY *et al.*, 1997;

SUWANTO & KAPLAN, 1989) e *Azospirillum* (MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000) pertencentes à sub-classe das  $\alpha$ -proteobactérias; *Burkholderia* (CHENG & LESSIE, 1994; RODLEY *et al.*, 1995; LESSIE *et al.*, 1996) das  $\beta$ -proteobactérias; alguns isolados de *Bacillus thuringiensis* (CARLSON *et al.*, 1996) e de espiroquetas do gênero *Leptospira* (ZUERNER *et al.*, 1993). Não há uma hipótese única para explicar a presença de mais de um cromossoma em bactérias. Alguns autores sugerem que pode ter ocorrido divisão desigual do cromossoma durante a replicação, quebra em diferentes posições gerando múltiplos replicons, além de mutações individuais nestes replicons, transferência horizontal ou ainda, plasmídeos convertendo-se em cromossomas por meio de aquisição de genes essenciais (KOLSTO, 1997; JUMAS-BILAK *et al.*, 1998). Em espécies do gênero *Brucella* as diferenças no número e tamanho de cromossomas podem ser explicadas por rearranjos em regiões do cromossoma contendo genes *rrn*. Diferentes rearranjos são provavelmente responsáveis pela presença de apenas um cromossoma no biovar 3, dois cromossomas nos biovars 1, 2 e 4 de *Brucella suis* (JUMAS-BILAK *et al.*, 1998).

Além do número, a geometria e o tamanho dos cromossomas das bactérias podem variar. Até recentemente, todos os cromossomas bacterianos eram classificados como circulares. Embora verdadeiro para a maioria das bactérias, um número crescente de exceções está sendo identificado. *Borrelia burgdoferi* apresenta um cromossoma linear, além de 20 plasmídeos lineares e circulares (FRASER *et al.*, 1997; CASJENS, 2000) e *Streptomyces* possui um cromossoma e plasmídeos lineares (DAVIDSON *et al.*, 1992; LUCHANSKY *et al.*, 1992; CASJENS & HUANG, 1993; CHEN, 1996). Em *Streptomyces*, SHIFFMAN & COHEN (1992) também observaram uma interconversão na geometria do replicon durante a replicação do cromossoma, de linear para circular. *Agrobacterium tumefaciens* apresenta dois cromossomas, sendo um linear e outro circular, além

de dois plasmídeos (ALLARDET-SERVENT *et al.*, 1993; JUMAS-BILAK *et al.*, 1995).

O tamanho dos cromossomas também varia entre as bactérias. O menor genoma conhecido é o de *Mycoplasma genitalium* com 580 Kb (FRASER *et al.*, 1995), e o maior é o de *Stigmatella erecta* com 9,9 Mb (NEUMANN *et al.*, 1992). Esta variação no tamanho dos cromossomas foi também observada em bactérias pertencentes às mesmas divisões filogenéticas. Por exemplo, entre as  $\alpha$ -proteobactérias encontram-se organismos com tamanho de genoma que varia entre 1,2 e 9,5 Mb (MORENO, 1998) e, entre os espiroquetas, de 910 Kb a 4,6 Mb. Esta variação no tamanho do genoma das bactérias pode estar relacionada ao seu "habitat". Os parasitas possuem um genoma menor, uma vez que utilizam parte da maquinaria do hospedeiro para sua sobrevivência. Já bactérias que apresentam um ciclo de vida mais complexo com estágios de desenvolvimento como formação de micélio ou esporulação, possuem um genoma mais complexo (CASJENS, 1998; MORENO, 1998; WREN, 2000).

## **1.5 - MÉTODOS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO BACTERIANA**

Recentemente muito progresso tem sido obtido na identificação e classificação de microrganismos devido ao desenvolvimento de metodologias moleculares eficientes e cada vez mais sensíveis. Na década de 80, vários métodos baseados em DNA foram desenvolvidos com o objetivo de identificação e tipagem de organismos procariotos e eucariotos (SAVELKOUL *et al.*, 1999). Estes métodos diferem em seu alcance taxonômico, poder discriminatório, reprodutibilidade, facilidade de interpretação e padronização (VANECHOUTTE, 1996; MOREL, 1997; OLIVE & BEAN, 1999). Além disso, a maioria das

técnicas moleculares depende da separação eletroforética de fragmentos de DNA, representada por um padrão de bandas visualizado em gel. Como estes padrões podem ser complexos, a interpretação dos resultados e escolha de uma determinada técnica de tipagem depende da facilidade com a qual os resultados serão interpretados e relacionados (ARBEIT, 1995). Os métodos de genotipagem apresentam diferentes capacidades discriminatórias, dependendo do nível taxonômico e categoria. Em bacteriologia, a discriminação ao nível de espécie é denominada de identificação, enquanto que tipagem significa diferenciação ao nível de linhagem ou estirpe, entre organismos de uma espécie (SAVELKOUL *et al.*, 1999).

Apesar dos esforços para uma classificação de bactérias ao nível de espécies, ainda não há uma definição clara dos critérios necessários para caracterizar espécies bacterianas, nem métodos padronizados para descrição de espécie. As definições iniciais baseavam-se em características bioquímicas, fenotípicas e morfológicas. Entretanto, microrganismos evolutivamente distintos podem não apresentar uma distinção marcante quando apenas estes parâmetros são avaliados (OLSEN *et al.*, 1986; WOESE, 1987; SMITH *et al.*, 1991; YOUNG, 1992; STALEY, 1999). Assim, os sistemas baseados na morfologia e fisiologia geraram erros de posicionamento filogenético de bactérias, quando comparados a técnicas de comparação molecular, como por exemplo, comparação de seqüência do gene 16S rRNA (WOESE, 1987). Atualmente, vários métodos com base na análise de material genético estão sendo utilizados para classificação de bactérias, que utiliza um grupo de organismos, incluindo a estirpe tipo, para definir as características das espécies (VANDAMME *et al.*, 1996). Além disso, o sequenciamento de proteínas e ácidos nucléicos permite medir as relações evolucionárias evolutivas entre organismos e relacioná-los em termos de relógio evolucionário (WILSON *et al.*, 1977). A informação genotípica é mais

rápida, confiável e precisamente interpretada, e fornece mais informação sobre as relações evolucionárias que as fenotípicas (WOESE, 1987).

A análise de macrofragmentos de restrição de DNA por eletroforese em campo pulsado e análise de fragmentos de DNA genômico por RFLP, juntamente com hibridização DNA-DNA utilizando como sonda genes essenciais como, por exemplo, o gene ribossômico 16S (16S rRNA), são métodos bastante eficazes para a comparação bacteriana. A tecnologia de PCR oferece possibilidades alternativas para identificação de organismos para os quais diferenciação ao nível de espécie é particularmente difícil (VANDAMME *et al.*, 2000).

### **1.5.1 – ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO**

Métodos eletroforéticos convencionais não permitem a separação de fragmentos de DNA com tamanho superior a 50 Kb (MANIATIS *et al.*, 1982). Moléculas maiores que 50 Kb migram praticamente com a mesma velocidade, um fenômeno denominado limite de mobilidade (SCHWARTZ & CANTOR, 1984). Além disso, é necessário garantir a integridade do DNA contra choques mecânicos e contra degradação por nucleases durante o processamento das amostras. SCHWARTZ & CANTOR (1984) utilizaram uma técnica especial para análise e resolução de fragmentos de DNA de alta massa molecular denominado de eletroforese em campo pulsado (PFGE: "pulsed-field gel electrophoresis"). A manipulação de cromossoma de levedura foi feita aprisionando as células em blocos de agarose com baixo ponto de fusão ("plugs"), antes de qualquer processamento. Em seguida, os "plugs" foram tratados para o rompimento e a remoção dos componentes celulares de forma que finalmente apenas o DNA intacto permanecesse aprisionado nos blocos de agarose. Os procedimentos para preparação de

cromossomas intactos são basicamente os mesmos para bactérias, fungos e outras células e tecidos e consiste na remoção da parede celular com enzimas e detergentes, e degradação de proteínas com proteases (CARLE & OLSON, 1984).

SCHWARTZ & CANTOR (1984) demonstraram que era possível separar moléculas maiores de DNA pela variação cíclica da orientação do campo elétrico no gel durante a corrida eletroforética. Com a mudança do campo elétrico, ocorre uma alteração conformacional e reorientação das moléculas de DNA na direção do novo campo elétrico antes que se inicie a migração. Deste modo, a migração se dá por uma série de passos em direções alternadas, com os campos elétricos regulados para assegurar que a migração se dê em linha reta. O tempo necessário para os fragmentos se reorientarem em cada mudança de direção do campo é dependente da massa molecular, ou seja, moléculas maiores demoram mais tempo para se re-alinharem após o campo elétrico ter sido alternado do que as menores, devido à barreira física da matriz de agarose. (SMITH *et al.*, 1988; MILLS & McCLUSKEY, 1990; BIRREN & LAI, 1993; HOOD, 1995). Segundo MILLS & McCLUSKEY (1990) o tempo do pulso elétrico aplicado ao gel deve ser selecionado para que as moléculas de DNA de um determinado tamanho gastem a maior parte da duração do pulso se reorientando, e não se movendo através do gel de agarose. Além do tamanho e número de fragmentos de DNA de alta massa molecular, PFGE pode também determinar a geometria das moléculas de ácido nucléico. Moléculas de DNA de alta massa molecular que apresentam topologia circular, não são capazes de migrar pela matriz de agarose, permanecendo intactas no poço de aplicação, mas moléculas lineares também de alta massa migram, o que faz com que esta diferença de geometria fique evidente durante uma corrida eletroforética (LEE *et al.*, 1996).

O termo eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi originalmente proposto por SCHWARTZ & CANTOR em 1984 para qualquer corrida eletroforética envolvendo campos elétricos alternados. Posteriormente, métodos alternativos de PFGE foram descritos, uma vez que não só a orientação do gradiente elétrico é importante, mas outras alterações nas eletroforeses também contribuem para a separação de DNA de alta massa molecular, como variação na geometria dos eletrodos, homogeneidade e método de reorientação dos campos elétricos. Alguns dos sistemas que separam moléculas de DNA de alta massa molecular são:

- a) OFAGE (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis), formado por dois campos elétricos não homogêneos (CARLE & OLSON, 1984);
- b) FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis), onde os campos elétricos formam um ângulo de  $180^\circ$  entre si (CARLE *et al.*, 1986);
- c) CHEF (Countor - Clamped Homogeneous Electric Fields), que utiliza múltiplos eletrodos organizados em forma de polígono (hexágono com ângulo de  $120^\circ$  ou  $60^\circ$  entre os campos elétricos ou quadrados com ângulo de  $90^\circ$  entre os campos) (CHU, 1986);
- d) TAFE (Transverse-Alternating-Field Electrophoresis), onde campos elétricos homogêneos são localizados transversalmente ao gel que fica numa posição vertical (GARDINER *et al.*, 1986; GARDINER & PATTERSON, 1988).

O limite máximo de tamanho resolvido por estes métodos parece não ser diferente. Entretanto, estes métodos variam na capacidade de resolução, da forma de migração das moléculas e velocidade de separação (BIRREN & LAI, 1993).

### **1.5.2 – POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO – RFLP**

RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") é definido como polimorfismo do comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA por endonucleases de restrição (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Os primeiros pesquisadores a utilizarem esta técnica foram Grodzicker e colaboradores (1974) (citado por FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995) com o objetivo de detectar mutações em DNA de adenovírus. Pouco tempo depois esta metodologia já estava sendo amplamente empregada em várias áreas da biologia, como na sistemática de bactérias (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; BUSSE *et al.*, 1996). Este método de classificação foi adaptado para a diferenciação de estirpes de bactérias pela localização de sítios de reconhecimento de endonucleases presentes em "loci" genéticos de interesse. O resultado observado após eletroforese dos fragmentos obtidos é analisado com base no tamanho das bandas resultantes, que poderão ser diferentes entre espécies não relacionadas e até mesmo entre estirpes de uma mesma espécie. Estas diferenças são resultantes de rearranjos no genoma e mutações afetando os tamanhos dos fragmentos de restrição (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; BUSSE *et al.*, 1996). O poder discriminatório do RFLP pode ser aumentado quando esta técnica é combinada à hibridização (RFLP-Southern blotting) de uma seqüência clonada (sonda) com fragmentos de DNA obtidos pela ação de endonucleases. A homologia entre a seqüência de nucleotídeos da sonda e a seqüência complementar de nucleotídeos de um fragmento de DNA revela o polimorfismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; SILVA & WITTEWER, 2000). Deste modo, RFLP refere-se a natureza polimórfica da localização de sítios de enzimas de restrição presentes em regiões genéticas

definidas (OLIVE & BEAN, 1999), além de inserções e ou deleções nestes sítios de reconhecimento.

A ribotipagem, uma variação do "RFLP-Southern blotting", utiliza sondas provenientes dos genes 16S e 23S rDNA, e tem sido empregada com sucesso na diferenciação entre linhagens de bactérias (GERNER-SMIDT, 1992; KOOPMAN, *et al.*, 1993, ESTRADA *et al.*, 2002; KOZINSKA *et al.*, 2002, SHAVER *et al.*, 2002, entre outros). Os resultados da ribotipagem baseiam-se em apenas algumas bandas, simplificando sua interpretação, embora esta característica possa limitar a capacidade da técnica em distinguir entre estirpes intimamente relacionadas (OLIVE & BEAN, 1999).

Algumas das principais limitações do uso de RFLP são dificuldade na interpretação dos resultados quando o experimento envolve grande número de organismos, obtenção de sondas adequadas, instalações apropriadas e pessoal técnico habilitado para manuseio de material radioativo (quando sondas marcadas radioativamente são utilizadas), além de custo elevado para realização dos experimentos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

### **1.5.3 – O GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA**

Desde a década de 70 quando WOESE e colaboradores começaram a investigar a filogenia de procariotos catalogando a seqüência do gene 16S rRNA, o conhecimento nesta área aumentou consideravelmente. A análise da seqüência do gene 16S rRNA de diferentes células possibilitou aos autores dividirem os organismos vivos em três Reinos denominados *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya* (WOESE *et al.*, 1990), que eram formalmente conhecidas como Archaeobacteria, Eubacteria e Eucaryotes (BUSSE *et al.*, 1996). Entretanto, juntamente com estes avanços nos estudos de filogenia, a taxonomia de bactérias sofria mudanças substanciais. Como a

sistemática bacteriana baseava-se em dados fisiológicos e morfológicos, os resultados obtidos pela comparação de seqüências do gene 16S rRNA eram freqüentemente conflitantes aos arranjos taxonômicos existentes naquela época (BUSSE *et al.*, 1996). Apesar disso, estudos utilizando o gene 16S rRNA foram amplamente difundidos em filogenia.

O 16S rRNA é um candidato ideal para estudos evolucionários e evolutivos, uma vez que apresenta características estruturais e funcionais ideais capazes de determinar relações filogenéticas (OLSEN *et al.*, 1986; WOESE, 1987; WEISBURG *et al.*, 1991; MORENO, 1998). O gene que codifica para o RNA ribossômico 16S é altamente conservado entre os Reinos *Bacteria* e *Archaea* (OLSEN *et al.*, 1986; WOESE, 1987), e estes genes são essenciais para funções biológicas e, seus transcritos não são traduzidos, o que resulta numa variabilidade menor quando comparados a outros genes.

Segundo OLIVER & BEAN (1999), para que uma seqüência de DNA possa ser utilizada na diferenciação entre estirpes, precisa preencher os seguintes critérios: a seqüência de DNA selecionada precisa ser variável e posicionada entre duas regiões altamente conservadas, o que permite a amplificação por PCR e tipagem dos membros de uma espécie; a variabilidade dentro da seqüência selecionada precisa ser suficiente para separar diferentes estirpes de uma dada espécie; finalmente, a seqüência selecionada não deve ser transmitida horizontalmente para outras estirpes da mesma espécie de forma freqüente, permitindo que o gene 16S rRNA seja amplamente utilizado nas análises filogenéticas. Algumas regiões da estrutura primária do 16S rRNA são altamente conservadas, enquanto outras possuem média ou baixa variabilidade entre indivíduos evolutivamente relacionados. Assim, o sequenciamento parcial ou completo do gene que codifica o 16S rRNA, seguido do alinhamento e comparação entre as seqüências constitui uma

ferramenta importante para a determinação de relações filogenéticas, além de auxiliar na determinação do número de cromossomos em vários organismos (WOESE, 1987; WEISBURG *et al.*, 1991).

Os genes rRNAs ribossômicos (que codificam para 5S, 16S e 23S rRNAs) estão tipicamente presentes em um único operon, juntamente com genes que codificam para moléculas de tRNAs e são transcritos de maneira a produzir quantidades equimolares de cada produto destes genes (KLAPPENBACH *et al.*, 2001). O número de operons rRNA apresenta grande variação entre as bactérias, podendo estar presente em apenas uma cópia, como em espécies de *Mycoplasma* (SAWADA *et al.*, 1981; FRASER *et al.*, 1995; HIMMELREICH *et al.*, 1996) e de *Mycobacterium* (COLE *et al.*, 1998) ou até dez cópias no genoma, como em *Bacillus subtilis* (KUNST *et al.*, 1997). Durante o crescimento exponencial, o número de operons *rrn* pode chegar a 36 cópias em *Escherichia coli* (BREMER & DENNIS, 1996). Além disso, pode existir diferença de bases entre as cópias dos genes 16S rRNA. *Deinococcus radiodurans* ATCC 13939 possui três cópias deste operon, podendo ocorrer diferença de duas bases neste gene. *E. coli* ATCC 10798 possui sete cópias do operon rRNA, e as diferenças entre os genes pode chegar a dezenove bases (KLAPPENBACH *et al.*, 2001).

Atualmente, a disponibilidade de seqüências do gene 16S rRNA de um grande número de bactérias pertencentes a vários grupos tem tornado o estudo filogenético bacteriano mais abrangente. Deste modo, é possível efetuar análises comparativas entre vários indivíduos pertencentes a diversos táxons, produzindo árvores filogenéticas mais consistentes.

#### **1.5.4 – POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO - RAPD**

A tipagem genética de organismos baseada em polimorfismo de DNA amplificado ao acaso é uma metodologia altamente discriminatória, envolvendo a utilização de um conjunto de iniciadores aleatórios para amplificar seqüências de DNA. Esta metodologia foi primeiramente descrita por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH & McCLELLAND (1990) e tem sido usada para distinguir vários grupos de procariotos, mas principalmente bactérias de relevância clínica, como por exemplo, na diferenciação de espécies intimamente relacionadas e dificilmente distinguíveis, como *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* (CZAJKA *et al.*, 1993) ou de estirpes de *Haemophilus sommus* (MEYERS *et al.*, 1993) e *Staphylococcus aureus* (SAULNIER *et al.*, 1993).

Polimorfismo de DNA ao acaso (RAPD) é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com uma característica distinta: utiliza um único iniciador por reação cuja seqüência é arbitrária sendo, portanto, sua seqüência alvo desconhecida (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Baseia-se, em parte, no fato de que a *Taq* DNA polimerase, utilizada na reação realizada por PCR, é parcialmente tolerante aos pareamentos errados entre iniciadores e o DNA alvo. Uma vez que a amplificação se dá em condições de baixa stringência, um único iniciador pode interagir com o DNA alvo em várias posições onde o pareamento seria imperfeito (SILVA & RUSSO, 2000). Por esta razão, os iniciadores utilizados na reação de amplificação são pequenos fragmentos de DNA, geralmente com 9 ou 10 pb, que anelam com afinidade suficiente às seqüências do DNA genômico sob baixas temperaturas de anelamento, de tal forma que podem ser usados para iniciar a amplificação de regiões do DNA bacteriano. Os iniciadores precisam se anelar ao DNA alvo dentro de

uma região de poucos kilobases de distância um do outro e em orientação contrária, para que ocorra a amplificação (OLIVE & BEAN, 1999). O número e localização destas regiões de anelamento variam para diferentes estirpes de uma mesma espécie. Tipicamente, cada iniciador arbitrário dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversas posições do genoma, resultando em várias bandas no gel (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Deste modo, o padrão de bandas resultante é característico de uma estirpe em particular (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990; CAETANO-ANOLLES *et al.*, 1991; MEUNIER & GRIMONT, 1993).

Apesar desta técnica apresentar grande poder discriminatório, vários problemas têm sido relacionados à padronização das condições de amplificação. A reprodutibilidade dos resultados em diferentes laboratórios e diferenças resultantes do termociclador utilizado aparecem como as principais limitações desta técnica (PENNER *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993). Entretanto, estudos realizados recentemente utilizando *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* demonstraram que o perfil de bandas amplificadas por RAPD apresenta reprodutibilidade e pode ser realizado por diferentes laboratórios apresentando os mesmos resultados (MEYER *et al.*, 1999). Da mesma maneira, LASKER (2002) afirmou que repetidas corridas utilizando a mesma amostra de DNA, bem como diferentes preparações de DNA da mesma estirpe de *Aspergillus fumigatus* resultaram em padrões altamente reprodutíveis, usando as técnicas de RFLP, RAPD, iniciador de seqüência específica (sequence-specific DNA primer, SSDP) ou ainda microsatélite marcador polimórfico (polymorphic microsatellite markers, PMM).

## 2 - OBJETIVOS

2.1 - Definir relações inter e intra-específicas utilizando métodos moleculares:

2.1.1 - Determinar geometria e tamanho do DNA genômico de *Herbaspirillum seropedicae* Z78;

2.1.2 - Comparar as seqüências do gene que codifica o 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* M2, ZA69, ZA95, Z152, Z67 e Z78 e da estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans*;

2.1.3 - Comparar o padrão de fragmentos de restrição do DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* M2, ZA69, ZA95, Z152, Z67 e Z78 e a estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans*.

2.1.4 - Comparar o padrão de amplificação aleatória do DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* M2, ZA69, ZA95, Z152, Z67 e Z78 e a estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans*.

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – BACTÉRIAS

As bactérias utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. As estirpes de *Herbaspirillum* foram cedidas pelo Programa Nacional de Pesquisas em Agrobiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Seropédica, Rio de Janeiro ou obtidas da coleção do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio – UFPR. As bactérias foram estocadas em glicerol 50% e mantidas a -20°C ou em meio NFbHP semi-sólido a temperatura ambiente.

Tabela 1 – Lista de Estirpes

Estirpes	Referência
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	
Z78	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
M2	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
Z69	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
ZA95	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
ZA152	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
Z67	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	
M4	BALDANI <i>et al.</i> , 1996

#### 3.2 – MEIOS DE CULTURA

As estirpes de *Herbaspirillum* foram cultivadas em meio NFb-malato (KLASSEN *et al.*, 1997) que apresenta a seguinte composição:

**MEIO NFb-malato**

	g/L
Ácido málico	5,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
NTA	0,02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,056
Solução de micronutrientes	

A solução de micronutrientes tem a seguinte composição e foi adicionado 10mL por litro de meio NFb-malato:

	g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	200
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	235
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	280
CUSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	80
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	24

O pH foi ajustado para 6,5 com KOH 70%. Ao meio NFb esterilizado foram adicionados solução de fosfatos (50mL para 1000mL de NFb-malato) e NH<sub>4</sub>Cl (20mmol/L final), sendo então denominado NFbHPN. A solução de fosfatos apresenta a seguinte composição:

	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	159,5

Ao meio semi-sólido foram adicionados 1,8g/L de ágar e, no meio sólido, 15g/L de ágar. Todos os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atmosfera de pressão, por 20 minutos.

Para crescimento da estirpe Z78 de *H. seropedicae* foi adicionado ao meio de cultura estreptomicina, na concentração final de 80µg/mL. A solução estoque de estreptomicina foi preparada em

água destilada e esterilizada por filtração em filtro Millipore HAWP (0,22 $\mu$ m). As soluções estoque de antibiótico foram mantidas a -20°C.

### **3.3 – CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS**

As células de *Herbaspirillum* foram crescidas a 30°C sob agitação constante (150rpm) em 50mL de meio NFbHPN (KLASSEN *et al.*, 1997).

### **3.4 – REAGENTES QUÍMICOS**

Lisozima, Proteinase K, Tris-base, SDS, RNase, Triton X-100, agarose para eletroforese em campo pulsado e antibióticos foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Agarose de baixo ponto de fusão, fenol, marcadores de massa molecular 1Kb ladder,  $\lambda$  *Hind*III e 100pb foram da Life-Technologies. Etanol, isopropanol, clorofórmio, álcool isoamílico foram adquiridos da Merck. As enzimas de restrição foram adquiridas da Amersham Biosciences, Life Technologies ou New England Biolabs. O nucleotídeo marcado [ $\alpha^{32}$ P] (dCTP) foi obtido da Amersham Biosciences. Extrato de Levedura, triptona e ágar bacteriológico foram adquiridos da Merck, Oxoid ou Biobrás. Os marcadores de massa molecular utilizados nos experimentos de PFGE foram *Sacharomyces cerevisiae* e  $\lambda$  DNA-PFGE (Amersham Biosciences e Biolabs), *Hansenulla wingei* e *Schyzosacharomyces pombe* (Bio-Rad). A água ultrapura foi obtida com aparelho Milli-Q (Milli-Q<sub>PLUS</sub>, Millipore) e esterilizada em autoclave.

### 3.5 – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Na Tabela 2 estão listadas as endonucleases de restrição utilizadas neste trabalho e os respectivos sítios de clivagem.

**Tabela 2** – Enzimas de restrição utilizadas

Enzima	Sítio de reconhecimento 5' → 3'	Fornecedor
<i>Swa</i> I	ATTTAAAT	New England Biosciences
<i>Pac</i> I	TTAATTAA	New England Biosciences
<i>Xba</i> I	TCTAGA	INVITROGEN
<i>Dra</i> I	TTTAAA	INVITROGEN
<i>Hind</i> III	AAGGTT	INVITROGEN
<i>Eco</i> RI	GAATTC	INVITROGEN
<i>Sa</i> I	GTCGAC	LFN*

\* Purificada no Laboratório de Fixação de Nitrogênio, UFPR.

### 3.6 – PREPARO DE DNA GENÔMICO

O preparo de DNA genômico de alta massa molecular foi realizado conforme descrito por LEE *et al.* (1996).

As bactérias foram crescidas em 10 mL de meio NFb-malato como descrito no item 3.3 até densidade ótica (600nm) de 0,6. As culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, o sedimento foi ressuscitado em 400µL de solução SET (Tris 10mmol/L pH7,5; EDTA 100mmol/L, pH8,0; NaCl 100mmol/L) e foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão a 1,0% em água destilada na temperatura de 37°C. A mistura foi homogeneizada lentamente com pipeta, colocada nos moldes de plástico (com volume para 100µL) e mantida a 4°C por 15 minutos

plástico (com volume para 100 $\mu$ L) e mantida a 4°C por 15 minutos para geleificação. Os blocos de agarose contendo as células foram então transferidos para a solução de lise bacteriana (Tris.HCl 10mmol/L pH7,5; NaCl 50mmol/L; EDTA 100mmol/L; desoxicolato de sódio 0,2% e lauril sarcosil de sódio 0,5%), contendo RNase (1 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e lisozima (1mg.mL<sup>-1</sup>) e foram incubados a 37°C por 24 horas. Após este período, os blocos de agarose foram transferidos para solução DB (EDTA 0,5mol/L pH 8,0 e lauril sarcosil de sódio 1,0%) acrescida de proteinase K (0,1mg.mL<sup>-1</sup>) e incubados por 48 horas a 50°C. Os blocos contendo DNA total foram estocados em solução DB a 4°C.

### **3.7 - CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO DO DNA APRISIONADO EM AGAROSE**

Os blocos de agarose contendo o DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* foram submetidos à incubação por duas horas com TE (Tris.HCl 10mmol/L pH7,5 e EDTA 1mmol/L) e PMSF (1mmol/L) por três vezes consecutivas. Em seguida, foram lavados 3 vezes com TE por 30 minutos cada lavagem. Todas estas incubações foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante. Após este procedimento, os blocos foram mantidos em tubos tipo Eppendorf no gelo por 30 minutos com 100 $\mu$ L de tampão de restrição adequado para cada enzima utilizada. A solução foi então substituída por 50 $\mu$ L tampão de restrição fresco, acrescido da enzima de restrição a ser utilizada e 1 $\mu$ L de albumina bovina acetilada - BSA (10mg/mL) e mantida em banho de gelo por mais 1 hora. Os tubos foram então transferidos para banho-maria ajustado para a temperatura ótima da enzima utilizada e incubados por 16 horas.

A enzima *Sa/I* foi utilizada para a determinação da topologia do DNA de *H. seropedicae* em diferentes concentrações obtidas por

diluições seriadas a partir de 1 $\mu$ L da enzima até 0,0016 $\mu$ L. O volume final do sistema de restrição foi ajustado para 50 $\mu$ L e a incubação foi a 37°C por 5 minutos. A atividade enzimática foi inibida pela adição de 1mL de T<sub>1</sub>E<sub>10</sub> (Tris 1mM, e EDTA 10mM) ao sistema, e os blocos de agarose foram mantidos nesta solução até o momento de análise por eletroforese em campo pulsado.

### **3.8 - ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)**

O equipamento utilizado para a eletroforese em campo pulsado foi o Gene Navigator System (Amersham Biosciences), que produz campos elétricos alternados, orientados em ângulo fixo de 120°. Os parâmetros eletroforéticos como tempo de corrida, tempo dos pulsos aplicados e voltagem foram ajustadas de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA a serem separados em cada experimento, e estão especificados nas respectivas legendas. A temperatura de corrida foi mantida constante em 14°C para todos os experimentos. O tampão de corrida foi TBE 0,5X (Tris 45mmol/L, ácido bórico 45mmol/L e EDTA 1mmol/L; SAMBROOK *et al.*, 1989). Todos os géis obtidos neste estudo foram tratados com brometo de etídeo (0,5 $\mu$ g/mL) e fotografados sob luz ultravioleta.

### **3.9 - TRANSFERÊNCIA DE DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NÁILON**

A transferência do DNA por capilaridade ascendente foi realizada segundo SAMBROOK *et al.* (1989). Após a corrida eletroforética, o gel foi tratado com brometo de etídeo, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e a imagem registrada fotograficamente. Após este procedimento, o gel foi tratado sucessivamente com solução de depuração (0,25mol/L de HCl) por

10 minutos, solução desnaturante (NaOH 0,5 mol/L; NaCl 1,5 mol/L) por 30 minutos, solução neutralizante (Tris.HCl 1 mol/L pH7,5/ NaCl 1,5 mol/L) por 20 minutos, e solução de transferência SSC 15X (SSC 20X - NaCl 3 mol/L, citrato trissódico 0,3 mol/L pH 7,0) por 10 minutos. Uma tira de papel 3MM foi depositada em bloco de vidro e suas extremidades imersas na solução de transferência SSC 15X. O gel foi depositado sobre o papel 3MM com a face superior voltada para o papel e uma membrana de náilon (Hybond, Amersham Biosciences), com o mesmo tamanho do gel, umedecia em solução SSC 15X foi colocada sobre a face inferior do gel e coberta com 3 folhas de papel 3MM. Em seguida foi adicionada uma camada de papel absorvente de aproximadamente 10 cm sobre o papel 3MM, além de peso de 300g. Os fragmentos de DNA foram transferidos para a membrana de náilon por ação capilar ascendente imposta pelo papel absorvente por 24 horas.

Após a transferência, a membrana foi seca a temperatura ambiente e o DNA fixado à membrana pela exposição à luz ultravioleta (312nm) por 4 minutos. Após a transferência do DNA para a membrana, o gel foi novamente tratado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado em luz ultravioleta para confirmar a eficiência da transferência. Foi utilizada membrana de náilon não carregada ou carregada positivamente ("Hybond" N ou N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences).

### **3.10 – OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E MARCAÇÃO DAS SONDAS**

As sondas utilizadas nos experimentos de hibridização foram obtidas por amplificação parcial do gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* por PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para este gene. As condições empregadas na reação de PCR estão descritas no item 3.17. O produto da reação de PCR foi

aplicado em gel de agarose de baixo ponto de fusão (1%), submetido à corrida eletroforética, tratado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em luz ultravioleta. A banda de interesse foi retirada do gel e o DNA extraído. Para cada 100µL de gel fundido foram adicionados 100µL de tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>NaCl<sub>400</sub> (Tris 10mmol/L, EDTA 1mmol/L e NaCl 400 mmol/L) e 200µL de fenol equilibrado (pH 8,0). A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos para separação das fases. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e 200µL de água ultrapura foram adicionados à fase orgânica. Após centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm, a fase aquosa foi novamente separada e o DNA foi precipitado com etanol absoluto (2,5 volumes), incubado em gelo por 15 minutos, e centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado duas vezes com 1mL de etanol 80% e centrifugado (5 minutos a 13.000 rpm). O DNA extraído foi seco à vácuo e dissolvido em 10µL de água ultrapura esterilizada.

Os fragmentos de DNA contendo o gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* foram marcados radioativamente com o nucleotídeo dCTP [<sup>32</sup>P], segundo FEINBERG & VOGELSTEIN (1984). Nesta marcação foram utilizados 25ng de DNA desnaturado, 10µL de tampão OLB (soluções A, B e C na proporção de 10:25:15) acrescidos de 12µL de água ultrapura esterilizada. Após fervura da mistura de reação por 15 minutos e incubação em banho de gelo, foram adicionados 2µL de BSA (10mg/mL), 2,5 U da enzima Klenow (fragmento da DNA Polimerase I) e 25 µCi de dCTP marcado com [<sup>32</sup>P]. A reação de marcação ocorreu à temperatura ambiente por 24 horas.

A solução A continha 1mL da solução O (Tris.HCl 1,25mol/L e MgCl<sub>2</sub> 0,125mol/L pH 8,0), 18µL de β-mercaptoetanol e 5µL dos nucleotídeos, dATP, dTTP e dGTP (25µmol/L); a solução B consiste

MOPS 2mol/L pH7,0; e a solução C é a mistura de hexadesoxinucleotídeos (90 U/ $\mu$ L).

### **3.11 – HIBRIDIZAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Herbaspirillum*.**

As membranas de náilon contendo DNA a ser hibridizado foram incubadas em garrafas de vidro por 2 a 4 horas a 65°C, em 40 a 60mL de solução de pré-hibridização (SSC 5X, SDS 2% e 200 $\mu$ g/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado). A sonda marcada foi desnaturada em banho-maria fervente por 5 minutos, rapidamente resfriada em banho de gelo, e adicionada ao sistema de hibridização que foi mantido a 65°C por 24 horas, em sistema rotatório constante em forno de hibridização ("Hybaid"). Em seguida, a membrana de náilon foi lavada com 40 a 60mL de solução contendo SSC 0,1X e SDS 0,5 % a 65°C por 30 minutos, para remoção de excesso de sonda.

Os fragmentos de DNA hibridizados foram detectados por autoradiografia. As membranas foram colocadas em suporte plástico, seladas com filme plástico e auto-radiografadas com filme de raios-X (Amersham Biosciences) a -70°C por um período de 12 a 24 horas, utilizando-se placa amplificadora.

### **3.12 - PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO**

Culturas de *Herbaspirillum* foram crescidas como descrito no item 3.3, transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas a 13.000rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados mais 1,5mL da suspensão de células neste mesmo tubo, para aumentar a quantidade de células. O sedimento celular foi ressuspenso em 500 $\mu$ L de tampão SET (Tris 10mmol/L pH7,5; EDTA 100mmol/L, pH8,0; NaCl 100mmol/L) e 300 $\mu$ g/mL de lisozima

foram adicionados ao sistema que foram incubados a 30°C por, pelo menos, uma hora para lisar as células. Após este procedimento, foram adicionados ao sistema 200µg/mL de pronase E seguido de incubação a 37°C por cerca de 16 horas. A seguir, um volume de fenol equilibrado com Tris.Hcl (pH 8,0) foi adicionado ao sistema para extração de proteínas e centrifugado a 13.000rpm por 20 minutos. A fase aquosa foi removida para tubo novo, com o auxílio de ponteiros com as extremidades cortadas para evitar quebra mecânica na molécula de DNA, tratada com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugada. A fase aquosa foi tratada pelo menos três vezes desta maneira, até que não houvesse formação de precipitado na interface das fases aquosa e orgânica. Na última extração o fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foi substituído por clorofórmio. O DNA foi então precipitado com etanol absoluto, transferido para tubo novo com auxílio de bastão de vidro e lavado com etanol 80%. Este material foi seco à vácuo e solubilizado em 100µL de água ultrapura esterilizada.

### **3.13 – POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO – RFLP**

O DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* foi extraído e purificado como descrito no item 3.12. Após este procedimento, foram realizados ensaios de restrição utilizando as endonucleases *DraI* ou *HindIII*. As reações foram incubadas por 16 horas a 37°C, e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. O perfil eletroforético originado foi analisado para presença (1) ou ausência (0) de bandas e os resultados, convertidos em dados binários. Os coeficientes de similaridade para todas as combinações entre os pares foram determinados pelo coeficiente de Dice (Dice, 1945).

### 3.14 – POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO – RAPD

A reação de amplificação de fragmentos de DNA ao acaso foi realizada utilizando 10 ng de DNA genômico de cada estirpe com o Kit Ready.To.Go™ RAPD Analysis Beads Kit (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* foi obtido como descrito no item 3.12. Os iniciadores utilizados para amplificação ao acaso dos fragmentos de DNA estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** – Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação de DNA ao acaso

Iniciadores	Seqüência (5'→3')	Referência
Iniciador 1	GGTGCGGGAA	Amersham Bioscience
Iniciador 2	GTTTCGCTCC	Amersham Bioscience
Iniciador 3	GTAGACCCGT	Amersham Bioscience
Iniciador 4	AAGAGCCCGT	Akopyanz <i>et al.</i> , 1992
Iniciador 5	AACGCGCAAC	Akopyanz <i>et al.</i> , 1993
Iniciador 6	CCCGTCAGCA	Akopyanz <i>et al.</i> , 1994

### 3.15 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA POR PCR

No sistema de 25µL de reação de amplificação foram utilizados: tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5mmol/L e Tris.HCl 10 mmol/L, pH 9,0), dNTP (200µmol/L de cada), 0,4 µmol/L de cada iniciador (Y1 e Y3), *Taq* DNA polimerase (1U), e 10 µL da suspensão de células diluídas (50µL das culturas fervidas diluídas em 450µL de água ultrapura esterilizada) ou DNA genômico purificado (entre 50 e 100ng). O volume final de 25µL foi ajustado com adição de água ultrapura esterilizada. A reação de

amplificação do gene que codifica o 16S rDNA foi realizada em termociclador PE Biosystem 9600 com os seguintes ciclos de temperatura: desnaturação inicial a 93°C por 2 minutos; 34 ciclos de desnaturação a 93°C por 45 segundos; anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

O DNA amplificado foi precipitado com 2/3 do volume de acetato de amônio 7,5 mol/L e 2 volumes de etanol absoluto, por 7 minutos. A mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 7 minutos, lavada com etanol 80%, seca a vácuo e ressuspensa em 20µL de água milliQ esterilizada. Uma alíquota de 3µL deste material foi submetida à eletroforese em gel de agarose para verificar a qualidade de DNA amplificado e estimar a concentração. O material amplificado foi utilizado para a reação de sequenciamento. Os iniciadores utilizados para amplificação do gene que codifica o 16S rRNA foram Y1 e Y3 e os utilizados para seu sequenciamento foram Y1, Y2, Y3, 16S362f, 16S786f, 16S1203f, 16S1110r e 16S805r (Tabela 4).

### **3.16 - SEQUENCIAMENTO DO GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA DAS ESTIRPES DE *Herbaspirillum***

Para o sequenciamento do gene que codifica o 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum* foram utilizados 5µL dos produtos de PCR, um dos oito iniciadores descritos na Tabela 4 (10pmol/L), 8µL de "DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit" (Amersham Biosciences) e água ultrapura esterilizada para volume final de 20µL. Este procedimento foi realizado para todos os iniciadores. O termociclador foi programado com: 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas por 20 minutos após a adição de 60µL

**Tabela 4** – Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene que codifica o 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum*

Iniciadores	Seqüência (5'→3')	Referência
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	Young <i>et al.</i> , 1991
Y2	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	Young <i>et al.</i> , 1991
Y3	CTGACCCCACTTCAGCTTGTTCCAT	Cruz <i>et al.</i> , 2001
16S362f	CTCCTACGGGAGGCAGTGGGG	Soares-Ramos <i>et al.</i> , 2003
16S786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	Soares-Ramos <i>et al.</i> , 2003
16S1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	Soares-Ramos <i>et al.</i> , 2003
16S1110r	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	Soares-Ramos <i>et al.</i> , 2003
16S805r	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	Soares-Ramos <i>et al.</i> , 2003

de isopropanol e 20µL de água milliQ esterilizada, centrifugadas a 13.000rpm por 30 minutos, lavadas com etanol 80% e novamente centrifugadas, a 13.000rpm por 5 minutos. As amostras foram secas a vácuo, dissolvidas em formamida deionizada e mantidas a -20°C até análise em sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystem).

### 3.17 - PROGRAMAS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE DNA

A edição e montagem das seqüências de ácidos nucléicos foi realizada usando o programa BioEdit (HALL, 1999). O alinhamento das seqüências de DNA obtidas foi feito utilizando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). A montagem das seqüências contíguas e comparação com o banco de dados GenBank foram realizadas empregando os programas CAP (HUANG, 1992) e BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), respectivamente.

A árvore filogenética foi construída usando o método neighbor-joining, com o programa MEGA 2 (KUMAR *et al.*, 2001). Os dendrogramas foram obtidos pela utilização do programa NTSYS pc

2.0 (Exeter Software – scientific software for teaching and research – <http://www.exetersoftware.com/index.html>).

## 4 - RESULTADOS

*Herbaspirillum seropedicae* foi descrito por BALDANI *et al.* (1986). Posteriormente, BALDANI *et al.* (1996), baseados em estudos morfológicos, fisiológicos e de hibridização DNA-DNA, sugeriram uma revisão taxonômica, incluindo *Pseudomonas rubrisubalbicans* no gênero *Herbaspirillum*, como *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996) (Tabela 1).

Neste trabalho analisamos molecularmente as estirpes de *Herbaspirillum* por eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RLFP - "Restriction Fragment Length Polymorphism"), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD - "Random Amplified polymorphic DNA") e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

A estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* Z78 foi analisada em maior detalhe, incluindo a determinação da geometria e tamanho do genoma.

### 4.1 - GEOMETRIA E TAMANHO DO GENOMA DE *H. seropedicae* Z78 POR PFGE

A geometria (linear ou circular) e o tamanho da molécula de DNA de *H. seropedicae* Z78 foram determinados por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Moléculas de DNA circulares de alta massa molecular não migram em gel de agarose em eletroforese em campo pulsado e aparecem como uma única banda no local de aplicação do DNA no gel, após tratamento com brometo de etídeo (SCHWARTZ & CANTOR 1984; LEE *et al.*, 1996).

A Figura 1 mostra o perfil de migração do cromossoma de *H.*

**Figura 1** – Perfil de migração do DNA intacto de *H. seropedicae* Z78 em eletroforese em campo pulsado.



Eletroforese em campo pulsado de amostras não digeridas de DNA de *H. seropedicae* Z78. As amostras foram aplicadas em gel de agarose e submetidas à eletroforese conforme descrito em Material e Métodos (item 3.8). A corrida foi realizada com pulsos de 60 segundos por 15 horas seguidos por pulsos de 90 segundos por 9 horas, a 200V.

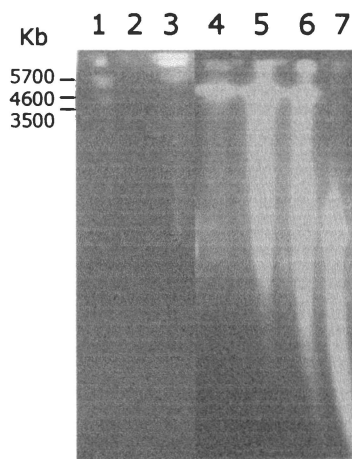
*seropedicae* Z78 em PFGE. Todo DNA permaneceu no local de aplicação da amostra, sugerindo uma geometria circular para esta molécula de DNA.

Como DNA circular de alta massa molecular não migra em gel durante PFGE, a estimativa do tamanho do cromossoma de *H. seropedicae* Z78 foi realizada após a linearização desta molécula. O cromossoma de *H. seropedicae* Z78 foi linearizado com a enzima *SaI*, em diferentes concentrações, por um período de 5 minutos a fim de produzir um único corte no DNA cromossômico. As diferentes concentrações de *SaI* foram obtidas por diluições seriadas e, neste ensaio, variaram de 0,0016 a 1 $\mu$ L. Uma única banda foi observada (Figura 2, linha 3) correspondente à molécula de DNA genômico linearizada apresentando migração correspondente ao tamanho de 5,7Mb. Nas demais linhas desta figura, pode-se observar DNA genômico parcialmente digerido, resultado do excesso de enzima. Este resultado indica que o genoma de *H. seropedicae* Z78 é constituído por um único cromossoma, com aproximadamente 6Mb de tamanho (Figura 2).

#### **4.2 - PERFIL DE RESTRIÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *H. seropedicae* ESTIRPE Z78 COM ENZIMAS DE SÍTIOS RAROS E HIBRIDIZAÇÃO COM O GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA**

O perfil dos macrofragmentos de restrição do DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 obtidos pela digestão com as enzimas de restrição *SwaI* e *PacI* foi determinado e analisado. Os fragmentos de DNA resultantes foram analisados por eletroforese em campo pulsado (PFGE), em condições de corrida capazes de discriminar entre fragmentos pertencentes a duas faixas de tamanho: 150 a 2000Kb (24 horas de corrida eletroforética, Figuras 3 e 4) e 200 a 3500Kb (48 horas de corrida eletroforética, Figura 5). Os tamanhos médios

**Figura 2** – Perfil de migração do DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 parcialmente clivado submetido a eletroforese em campo pulsado



Análise por PFGE do DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 após digestão parcial com a enzima *Sa*I. As condições utilizadas estão descritas em Material e Métodos (item 3.8). A eletroforese foi realizada com pulsos de 60 segundos por 15 horas seguidos por pulsos de 90 segundos por 9 horas, a 200V.

Linha 1 - marcador molecular *Schyzosacharomyces pombe* (Bio-Rad);

Linha 2 – DNA intacto de *H. seropedicae* Z78;

Linha 3 – DNA de *H. seropedicae* parcialmente digerido com 0,0016  $\mu$ L de *Sa*I;

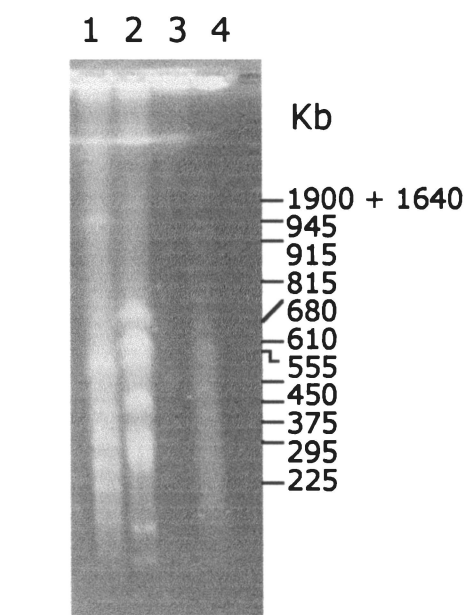
Linha 4 – DNA de *H. seropedicae* parcialmente digerido com 0,08  $\mu$ L de *Sa*I;

Linha 5 – DNA de *H. seropedicae* parcialmente digerido com 0,04  $\mu$ L de *Sa*I;

Linha 6 – DNA de *H. seropedicae* parcialmente digerido com 0,02  $\mu$ L de *Sa*I;

Linha 7 - DNA de *H. seropedicae* parcialmente digerido com 1  $\mu$ L de *Sa*I.

**Figura 3** – Perfil de migração dos fragmentos de DNA genômico de baixa massa molecular de *H. seropedicae* Z78 em eletroforese em campo pulsado.



O DNA genômico foi digerido com endonucleases de corte raro como descrito em Material e Métodos (item 3.8). Condições de corrida: 24 horas com pulsos de 30 a 120 segundos, a 200 V.

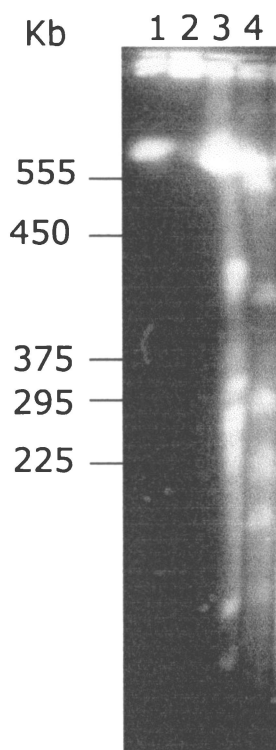
Linha 1 – DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *PacI*

Linha 2 - DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *SwaI*

Linha 3 – DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 intacto

Linha 4 – Marcador molecular *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad)

**Figura 4** - Perfil de migração dos fragmentos de DNA genômico de baixa massa molecular de *H. seropedicae* Z78 em eletroforese em campo pulsado.



O DNA genômico foi digerido com endonucleases de corte raro como descrito em Material e Métodos (item 3.8). Condições de corrida: 24 horas com pulsos de 30 a 75 segundos, a 200V.

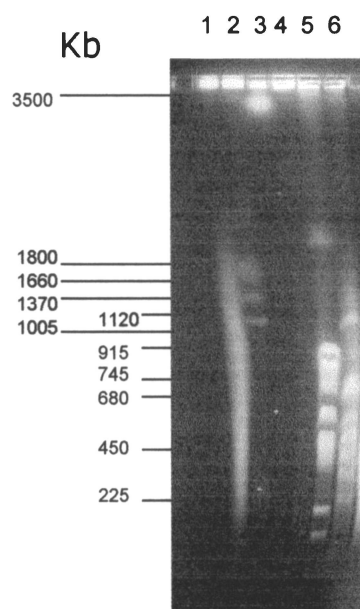
Linha 1 – Marcador molecular *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad)

Linha 2 - DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 intacto

Linha 3 – DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *Swa*I

Linha 4 – DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *Pac*I

**Figura 5** – Perfil de migração dos fragmentos de DNA genômico de média massa molecular de *H. seropedicae* Z78 em eletroforese em campo pulsado.



O DNA genômico foi digerido com endonucleases de corte raro como descrito em Material e Métodos (item 3.8). AS condições de corrida foram de 36 horas com pulsos em gradiente de 1 a 10 minutos seguidos por 12 horas com gradiente de 1 a 2 minutos, a 120V.

Linha 1 – Marcador molecular *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad);

Linha 2 - Marcador molecular *Hansenulla wingei* (Bio-Rad);

Linha 3 – Marcador molecular *Schyzosacharomyces pombe* (Bio-Rad);

Linha 4 – DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 intacto;

Linha 5 - DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *SwaI*;

Linha 6 - DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *PacI*.

dos fragmentos de DNA obtidos em três experimentos independentes, assim como condições de corrida e enzimas utilizadas, estão sumarizados na Tabela 5. O tamanho total do genoma de *H. seropedicae* Z78 obtido do DNA digerido com *Swa*I e *Pac*I foi de 5514Kb e 6107Kb, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com o valor obtido com DNA intacto linearizado (Figura 2) sendo possível suger um tamanho total do genoma de *H. seropedicae* Z78 de 5811Kb.

Os fragmentos de DNA gerados por restrição com a enzima *Swa*I separados por eletroforese em campo pulsado foram transferidos do gel de agarose para membranas de náilon e hibridizados com uma sonda contendo o gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 marcado radioativamente com [<sup>32</sup>P] (item 3.10). Três bandas de hibridização foram detectadas na autoradiografia correspondente ao DNA digerido com a enzima *Swa*I (Figura 6B), sugerindo a presença de, pelo menos, três cópias do gene em *H. seropedicae* Z78. As bandas de hibridização apresentam tamanhos de, aproximadamente, 440, 650 e 700Kb.

#### **4.3 - PERFIL DE RESTRIÇÃO COM ENZIMAS DE CORTE RARO DAS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* E HIBRIDIZAÇÃO COM GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA**

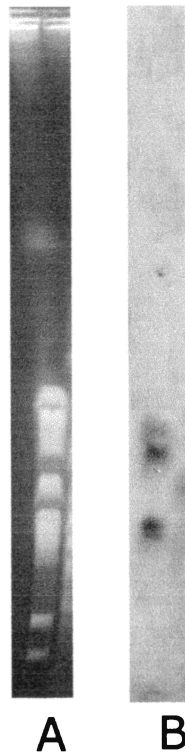
A análise eletroforética do DNA genômico intacto das estirpes de *Herbaspirillum* M2, M4, ZA69, ZA95, Z152 e Z67 mostrou o mesmo comportamento quando comparada a estirpe de *H. seropedicae* Z78 (Figura 1). Nenhuma migração foi observada, indicando topologia circular para estas moléculas (Figura 7). Entretanto, os resultados obtidos na análise comparativa do perfil de restrição gerado por endonucleases *Xba*I (dados não mostrados) e

**Tabela 5** – Fragmentos de restrição do DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 obtidos pela digestão com endonucleases de restrição de corte raro *SwaI* e *PacI*.

<i>SwaI</i>		<i>PacI</i>	
Fragmentos (Kb)	Desvio Padrão	Fragmentos (Kb)	Desvio Padrão
682	32,35	947	34,69
657	25,10	826	40,77
562	22,10	636	46,06
550	20,97	580	43,29
529	22,23	485	2,89
504	36,02	437	7,48
367	13,63	422	5,55
352	11,63	354	43,86
295	13,93	303	27,89
267	13,93	273	29,83
253	9,88	256	25,82
232	10,37	231	15,92
145	18,28	199	17,09
116	18,27	159	16,78
Total	5511	Total	6108

Os tamanhos dos fragmentos para cada enzima foram calculados por média aritmética utilizando três perfis de eletroforese em campo pulsado com diferentes condições de corrida: Perfil 1 – tempo de corrida: 24 horas; pulsos: 60-90s; voltagem: 200V (Figura 3). Perfil 2 – tempo de corrida: 24 horas; pulsos: 30-75s; voltagem: 200V (Figura 4). Perfil 3 – tempo de corrida: 48 horas; pulsos: 1-10 min (36hs) e 1- 2 min (12hs); voltagem: 120V (Figura 5).

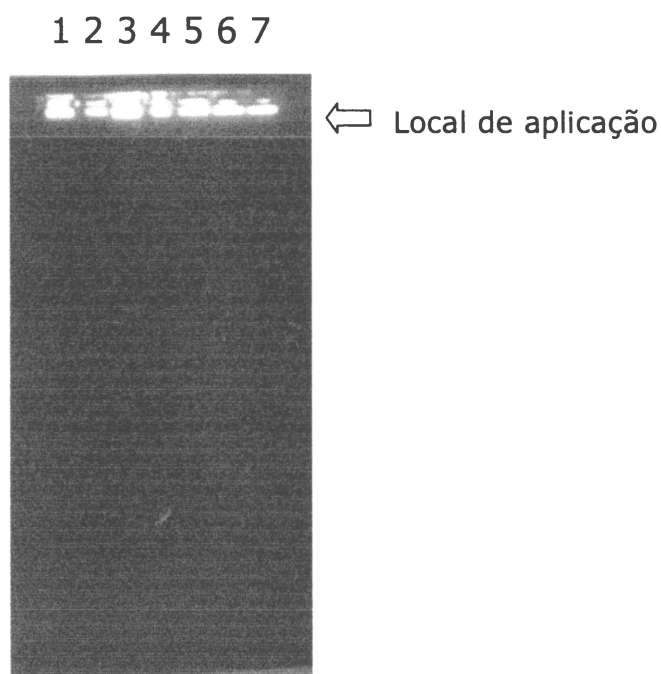
**Figura 6** – Perfil de hibridização do DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 com uma sonda contendo o gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78.



**A** – Eletroforese em campo pulsado do DNA digerido *Swa*I como descrito em Material e Métodos (item 3.8). As condições de corrida foram de 36 horas com gradiente de 1 a 10 minutos seguidos por 12 horas com gradiente de 1 a 2 minutos, totalizando 48 horas, a 120 V.

**B** – Auto-radiografia da hibridização com a sonda do gene que codifica o 16S rRNA marcado com [<sup>32</sup>P] (item 3.11) com o DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *Swa*I.

**Figura 7** – Perfil de migração do DNA genômico intacto das estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em eletroforese em campo pulsado.



Eletroforese em campo pulsado de amostras não digeridas das estirpes de *Herbaspirillum*. As amostras foram aplicadas em gel de agarose e submetidas à eletroforese conforme descrito em Material e Métodos (item 3.8). A corrida foi realizada com pulsos de 60 segundos por 15 horas seguidos por pulsos de 90 segundos por 9 horas, a 200V.

Linha 1 – *H. seropedicae* M2;

Linha 2 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 3 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA95;

Linha 5 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 6 – *H. seropedicae* Z67;

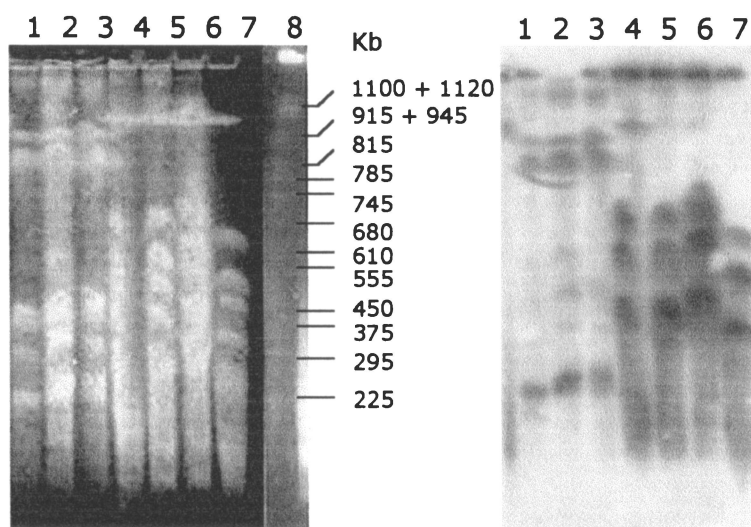
Linha 7 – *H. seropedicae* Z78.

*SwaI* indicam que existem diferenças no padrão de bandejamento destas estirpes. A melhor resolução foi obtida pela clivagem do DNA genômico com *SwaI* (Figura 8A). O número de fragmentos gerados por esta enzima variou de 12 para M2 e M4 a 14 fragmentos nas demais estirpes avaliadas. Estes resultados estão sumarizados na Tabela 6. Neste aspecto, o tamanho total do genoma destas estirpes variou de 5302Kb para M2 e M4 e 5329 Kb para Z69, Z95, Z152, Z67 e Z78. Este resultado é concordante com o tamanho de 5514Kb obtido anteriormente para a estirpe Z78, que representa a média de tamanhos obtidos em diferentes corridas. Os tamanhos das bandas da estirpe Z78 mostrados na Tabela 6 diferem daqueles apresentados na Tabela 5. Isto ocorre porque na Tabela 5 os tamanhos dos fragmentos foram determinados nas condições ótimas para cada faixa de massa molecular, sendo portanto, mais precisos.

Análise do perfil eletroforético do DNA genômico digerido com *SwaI* mostrou que as estirpes estudadas estão distribuídos em três diferentes grupos (Figura 8A). Apesar da presença de distorção entre as bandas na Figura 8A (principalmente a linha 7, referente a estirpe Z78 de *H. seropedicae*), este perfil foi sempre o mesmo em outras corridas utilizando as mesmas condições eletroforéticas. Os fragmentos de DNA gerados com *SwaI* foram transferidos para membrana de náilon e hibridizados com uma sonda do gene que codifica o 16S rRNA de *Herbaspirillum seropedicae* Z78 marcada radioativamente (Figura 8B). Os sinais de hibridização presentes na auto-radiografia confirmaram a distribuição destas estirpes em três grupos.

O primeiro grupo inclui as estirpes M2 de *H. seropedicae* e M4 de *H. rubrisubalbicans*, que apresentaram 12 fragmentos de restrição com a enzima *SwaI* e quatro destes fragmentos (975Kb, 891Kb, 857Kb e 283Kb) hibridizaram com o gene 16S rRNA (Figuras 8A e

**Figura 8** - DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *SwaI* e hibridizado com o gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78.



**A** - Eletroforese em campo pulsado do DNA digerido com *SwaI* conforme descrito em Material e Métodos (item 3.8). As condições de corrida foram de 24 horas, com pulsos de 60 segundos por 15 horas seguidos por pulsos de 90 segundos por 9 horas, a 200 V.

Linha 1 - DNA genômico de *H. seropedicae* M2 digerido com *SwaI*;

Linha 2 - DNA genômico de *H. rubrisubalbicans* M4 digerido com *SwaI*;

Linha 3 - DNA genômico de *H. seropedicae* ZA69 digerido com *SwaI*;

Linha 4 - DNA genômico de *H. seropedicae* ZA95 digerido com *SwaI*;

Linha 5 - DNA genômico de *H. seropedicae* Z152 digerido com *SwaI*;

Linha 6 - DNA genômico de *H. seropedicae* Z67 digerido com *SwaI*;

Linha 7 - DNA genômico de *H. seropedicae* Z78 digerido com *SwaI*;

Linha 8 - Marcador molecular *Scacharomyces cerevisiae* (Bio-Rad).

**B** - Auto-radiografia da hibridização com a sonda do gene que codifica o 16S rRNA marcado com [<sup>32</sup>P] (item 3.10) com o DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *SwaI*.

**Tabela 6** - Fragmentos de DNA gerados pela digestão do DNA genômico das diferentes estirpes de *Herbaspirillum* com enzima *SwaI*.

<b>Estirpes</b>	<b>Fragmentos gerados por <i>SwaI</i> (Kb)</b>	<b>Total (Kb)</b>
M2	975*; 891*; 857*; 539; 416; 406; 339; 330; 283*; 268; 242; 239	5783
M4	975*; 891*; 857*; 539; 416; 406; 339; 330; 283*; 268; 242; 239	5783
ZA69	975*; 891*; 857*; 539; 416; 406; 339; 330; 283*; 268	5302
ZA95	613*; 597*; 473; 461*; 438; 416; 366; 356; 313; 305; 290; 283; 218*; 197*	5328
Z152	613*; 597*; 473; 461*; 438; 416; 366; 356; 313; 305; 290; 283; 218*; 197*	5328
Z67	613*; 597*; 473; 461*; 438; 416; 366; 356; 313; 305; 290; 283; 218*; 197*	5328
Z78	613*; 597*; 473; 461*; 438; 416; 366; 356; 313; 305; 290; 283; 218*; 197*	5328

O DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* foi digerido com *SwaI* conforme descrito em Material e Métodos (item 3.8). As condições de corrida foram de 24 horas, com pulsos de 60 segundos por 15 horas seguidos por pulsos de 90 segundos por 9 horas, a 200 V. Os asteriscos indicam as bandas que hibridizaram com o gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78.

8B). O grupo II inclui a estirpe ZA69, com 10 fragmentos de restrição, sendo quatro (975Kb, 891Kb, 857Kb e 283Kb) com sinais positivos de hibridização com o gene 16Sr RNA. No grupo III estão as estirpes Z78, ZA95, ZA152 e Z67, apresentando 12 fragmentos de restrição e 5 bandas (613Kb, 597Kb, 461Kb, 218Kb e 197Kb) que hibridizaram com o gene 16S rRNA. Estes resultados diferem daquele da Figura 6, que mostra apenas 3 sinais de hibridização (440Kb, 650Kb e 700Kb) para o DNA da estirpe Z78 digerido com *SwaI*. Esta discrepância foi em decorrência da falta de sinal para os fragmentos de 197 e 218Kb, possivelmente devido à baixa intensidade destas duas bandas no gel original (Figura 6A). Os resultados obtidos com eletroforese em campo pulsado do DNA genômico das estirpes digerido com a enzima *SwaI* foram utilizados para construção de um diagrama esquemático de bandeamento (Figura 9) para facilitar a visualização e construção do dendrograma de similaridade (Figura 10). Os coeficientes de similaridade para todas as combinações entre pares foram determinados pelo coeficiente de Dice (DICE, 1945) e agrupados usando o método UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958). Este dendrograma agrupa as estirpes em três grupos: no grupo I encontram-se M2 e M4; o grupo II inclui Z69 e o grupo III foi formado pelas demais estirpes, ZA95, Z152, Z67 e Z78.

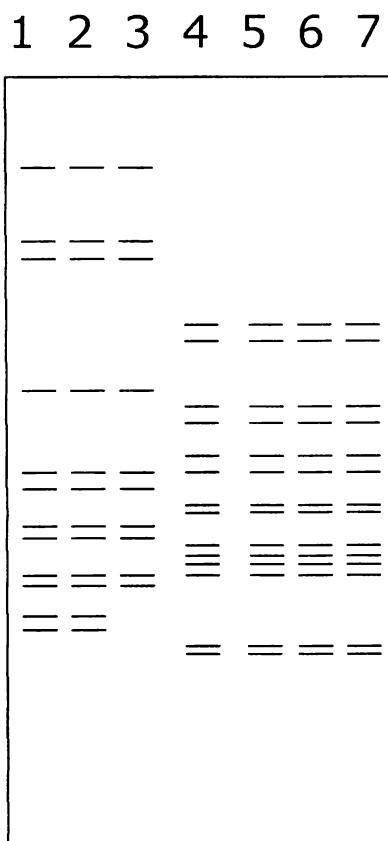
#### **4.4 – POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO – RFLP**

O DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* foi purificado, digerido com as endonucleases *HindIII* (Figura 11) ou *DraI* (Figura 12) e os fragmentos resultantes, analisados em gel de agarose convencional. Os perfis de restrição gerados por estas duas enzimas foram utilizados para construir um dendrograma (Figura 13). Os géis foram analisados e os resultados convertidos em dados binários, para

presença ou ausência de bandas. Os coeficientes de similaridade para todas as combinações possíveis entre os pares foram determinados utilizando coeficiente de Dice (DICE, 1945), e agrupados segundo médias aritméticas pelo método UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958).

Os padrões de restrição obtidos pelas endonucleases *Hind*III ou *Dra*I (Figura 11 e Figura 12, respectivamente) permitiram o agrupamento das estirpes em três grupos distintos. As estirpes M2 (*H. seropedicae*) e M4 (*H. rubrisubalbicans*) apresentaram padrões de restrição idênticos e foram agrupadas no grupo I. *H. seropedicae* Z67 e Z78 também apresentaram o mesmo perfil de restrição, com ambas enzimas, definindo um segundo grupo. As estirpes ZA95 e Z152 apresentaram o mesmo perfil *Dra*I de restrição, mas duas bandas diferentes foram identificadas no perfil *Hind*III (Figura 11). Apesar desta pequena diferença no perfil de restrição, no dendrograma (Figura 13) ZA95 e Z152 foram posicionadas no grupo II. *H. seropedicae* ZA69 apresentou um padrão de restrição diferente das demais estirpes e foi posicionada em um grupo separado, próximo ao grupo das estirpes M2 e M4.

**Figura 9** - Esquema de bandeamento da eletroforese em campo pulsado do DNA genômico digerido com *SwaI* (Figura 7) das estirpes de *Herbaspirillum* utilizado para construção do dendrograma.



Linha 1 – Estirpe M2 de *H. seropedicae*;

Linha 2 - Estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans*;

Linha 3 - Estirpe ZA69 de *H. seropedicae*;

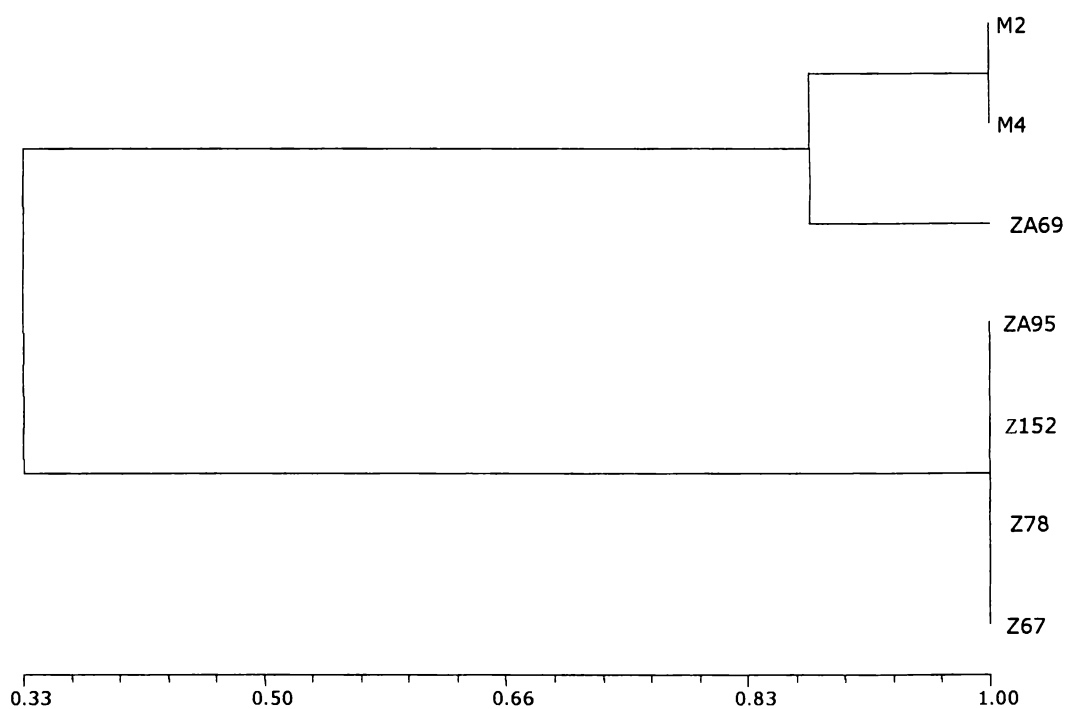
Linha 4 –Estirpe ZA95 de *H. seropedicae*;

Linha 5 – Estirpe Z152 de *H. seropedicae*;

Linha 6 – Estirpe Z67 de *H. seropedicae SwaI*;

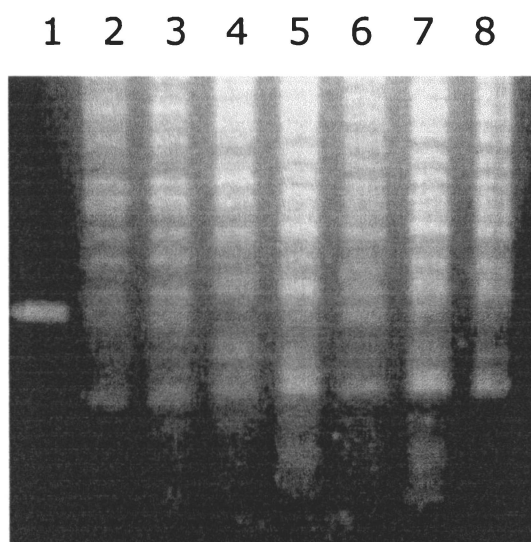
Linha 7 - Estirpe Z78 de *H. seropedicae*.

**Figura 10** - Dendrograma das sete estirpes de *Herbaspirillum* construído a partir do perfil de migração do DNA genômico, digerido com a endonuclease *SwaI*, por eletroforese em campo pulsado.



As similaridades foram calculadas usando o coeficiente de Dice (DICE, 1945) e as estirpes foram agrupadas pelo método UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958).

**Figura 11** – Perfil de migração dos fragmentos de DNA genômico digerido com a endonuclease *Hind*III das estirpes de *Herbaspirillum*.



Eletroforese convencional em gel de agarose 1% revelando o perfil de RFLP das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com a enzima *Hind*III.

Linha 1 – gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 (1500pb);

Linha 2 – *H. seropedicae* M2;

Linha 3 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA69;

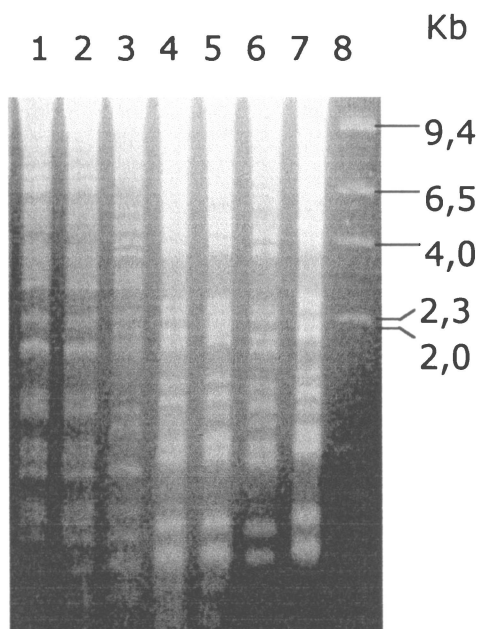
Linha 5 – *H. seropedicae* ZA95;

Linha 6 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 7 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 8 – *H. seropedicae* Z78.

**Figura 12** – Perfil de migração dos fragmentos de DNA genômico digerido com a endonuclease *DraI* das estirpes de *Herbaspirillum*.



Eletroforese convencional em gel de agarose 1% do perfil de RFLP das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com a enzima *DraI*.

Linha 1 – *H. seropedicae* M2;

Linha 2 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 3 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA95;

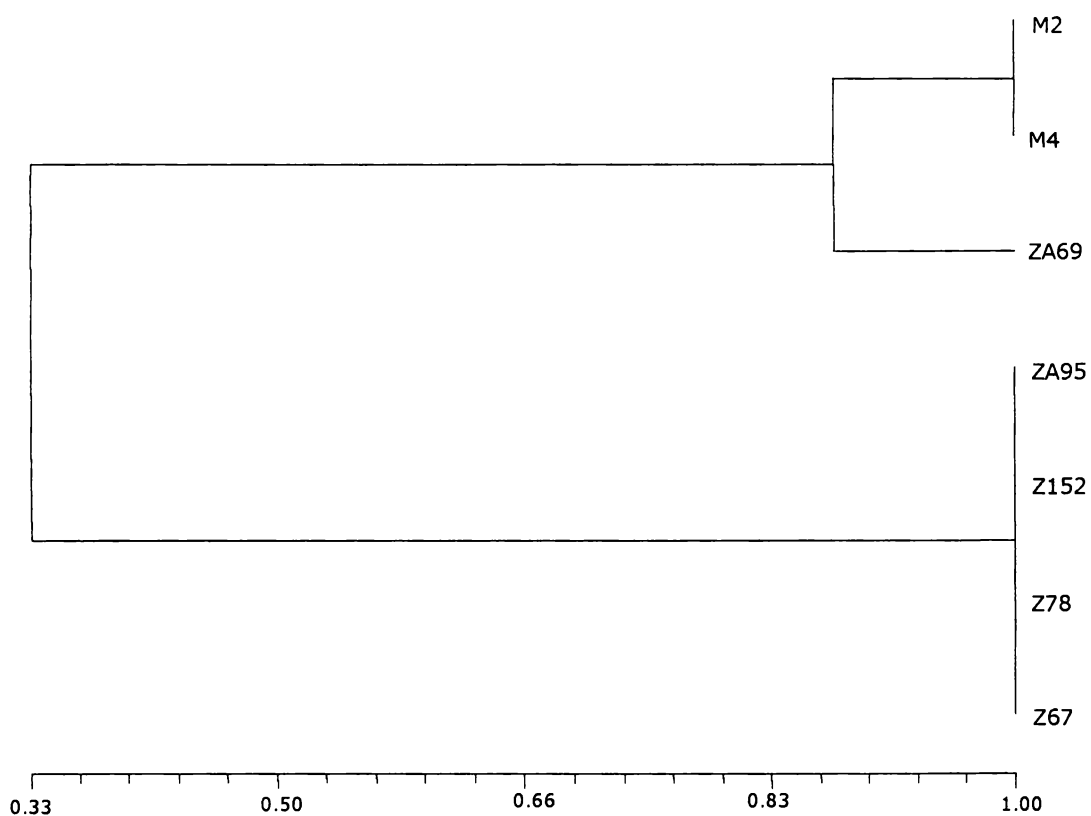
Linha 5 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 6 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 7 – *H. seropedicae* Z78;

Linha 8 - Marcador molecular – Lambda *HindIII* (Life-Technologies).

**Figura 13** – Dendrograma das estirpes de *Herbaspirillum* construído a partir do perfil obtido por RFLP pela digestão do DNA genômico com endonucleases *Hind*III e *Dra*I.



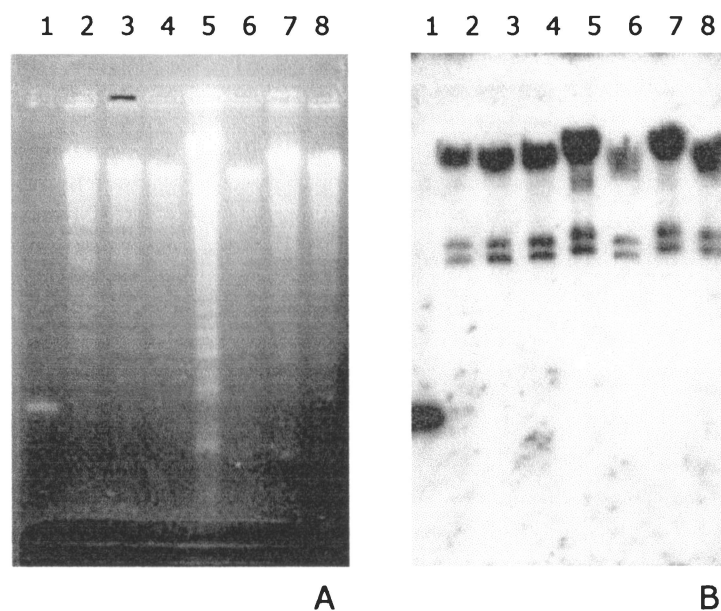
As similaridades foram calculadas usando o coeficiente de Dice (DICE, 1945) e as estirpes foram agrupadas pelo método UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958).

#### **4.5 - PERFIL DE RESTRIÇÃO DE ESTIRPES DE *Herbaspirillum* COM DIFERENTES ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO COM GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA**

O DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* foi purificado, digerido com *Hind*III, *Eco*RI e *Dra*I, submetido a eletroforese e hibridizado com sonda do gene 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 marcado com  $^{32}\text{P}$  (Figuras 14A, 15A, 16A). A auto-radiografia dos DNAs digeridos com *Hind*III (Figura 14B) revelou a presença de, pelo menos três bandas de hibridização para todas as estirpes. Além disso, a quantidade de DNA nas linhas 5 (estirpe Z95) e 7 (estirpe Z152) parece ser maior que nas demais, o que poderia explicar a distorção na corrida eletroforética. A auto-radiografia (Figura 15B), equivalente ao DNA genômico digerido com *Eco*RI (Figura 15A), mostra perfil semelhante para todas as estirpes, com visualização de 4 bandas de hibridização para o gene 16S rRNA de *H. seropedicae*. Nas linhas 1 (estirpe M2) e 2 (estirpe M4) da Figura 15B aparecem 5 sinais, mas provavelmente a segunda banda com maior massa molecular foi resultado de restrição parcial. A auto-radiografia do DNA clivado com *Dra*I (Figura 16B) mostra uma única banda de hibridização para cada estirpe de *Herbaspirillum*, e mais uma vez o excesso de DNA aplicado pode ter sido responsável por distorções no padrão obtido. O padrão de hibridização, portanto, foi semelhante para todas as estirpes e não pôde ser utilizado para separação das mesmas.

A conservação do padrão de hibridização entre estirpes sugere conservação de sítios de restrição na região do gene 16S rRNA. Além disso, o aparecimento de quatro bandas quando o DNA de *Herbaspirillum* foi digerido com *Eco*RI, que cliva dentro do gene 16S rRNA, sugere a presença de 2 cópias distintas deste gene em

**Figura 14** – Perfil de hibridização do DNA genômico das diferentes estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *Hind*III e hibridizado com o gene que codifica o 16S rRNA.



**A** – Eletroforese convencional em gel de agarose 1% do DNA genômico das estirpes digerido com *Hind*III.

Linha 1 – gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 (1500pb);

Linha 2 – *H. seropedicae* M2;

Linha 3 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 5 – *H. seropedicae* ZA95;

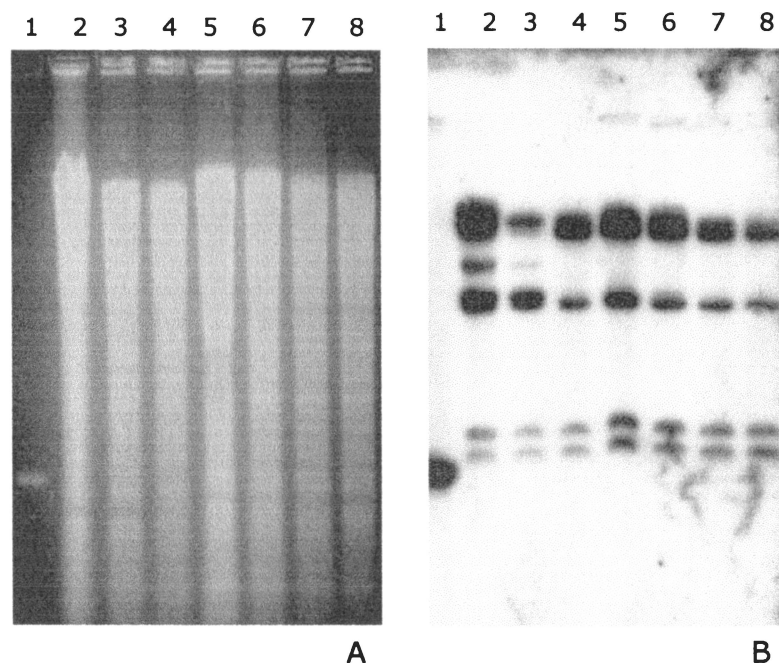
Linha 6 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 7 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 8 – *H. seropedicae* Z78.

**B** – Auto-radiografia da hibridização do gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 marcado com [<sup>32</sup>P] com o DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *Hind*III.

**Figura 15** – Perfil de hibridização do DNA genômico das diferentes estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *EcoRI* e hibridizado com o gene que codifica o 16S rRNA.



**A** – Eletroforese convencional em gel de agarose 1% do DNA genômico das estirpes digerido com *EcoRI*.

Linha 1 – gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 (1500pb);

Linha 2 – *H. seropedicae* M2;

Linha 3 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 5 – *H. seropedicae* ZA95;

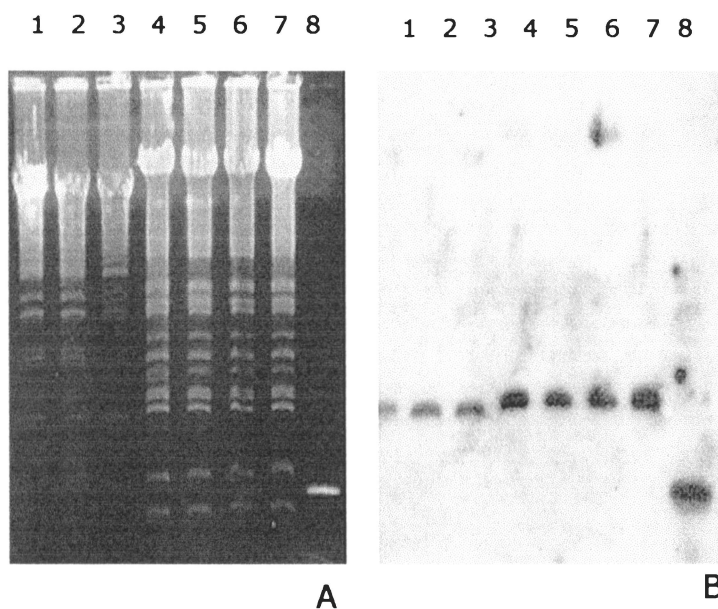
Linha 6 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 7 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 8 - *H. seropedicae* Z78.

**B** – Auto-radiografia da hibridização do gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 marcado com [<sup>32</sup>P] com o DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *EcoRI*.

**Figura 16** – Perfil de hibridização do DNA genômico das diferentes estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *DraI* e hibridizado com o gene que codifica o 16S rRNA.



**A** – Eletroforese convencional em gel de agarose 1% do DNA genômico das estirpes digerido com *DraI*.

Linha 1 – gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 (1500pb);

Linha 2 – *H. seropedicae* M2;

Linha 3 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 5 – *H. seropedicae* ZA95;

Linha 6 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 7 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 8 - *H. seropedicae* Z78.

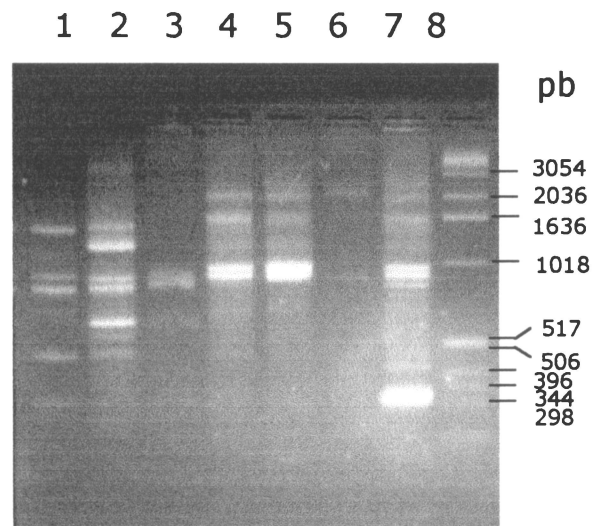
**B** – Auto-radiografia da hibridização do gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z78 marcado com [<sup>32</sup>P] com o DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* digerido com *DraI*.

*Herbaspirillum*. Este resultado está de acordo com os resultados de hibridização do padrão de eletroforese em eletroforese em campo pulsado com sonda 16S rRNA, que indicou 5 cópias deste gene.

#### **4.6 – POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO - RAPD**

A diversidade genômica das estirpes de *Herbaspirillum* também foi avaliada pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Seis diferentes iniciadores, previamente descritos para caracterização de linhagens bacterianas (Amersham Biosciences), foram utilizados para as reações de RAPD (Tabela 4). Cada um dos iniciadores gerou um perfil eletroforético único para cada uma das estirpes analisadas (Figuras 17 a 22). A análise destes padrões resultou em um dendrograma (Figura 23) que está de acordo com os resultados obtidos pelos métodos PFGE e RFLP. Mais uma vez, as estirpes M2 e M4 foram inseridas no grupo I, com coeficiente de similaridade de, aproximadamente, 65%. A estirpe ZA69 foi posicionada no grupo II, isolada das demais estirpes, com o coeficiente de similaridade entre os grupos I e II de 40%. Todas as outras estirpes foram alocadas a um grupo principal, mas localizadas em posições distintas no dendrograma, formando dois sub-grupos: ZA95 e Z78, com similaridade de 72%, e Z152 e Z67, com similaridade de 65%. É importante ressaltar que todas as estirpes puderam ser diferenciadas por pelo menos uma banda, quando foram utilizados os iniciadores 2,3,4,5 ou 6 (Tabela 7). Este método apresentou maior poder discriminatório, apresentando maior sensibilidade que os demais, resultando numa maior separação entre as estirpes.

**Figura 17** - Perfil de amplificação ao acaso de DNA das estirpes de *Herbaspirillum* com o iniciador 1.



Eletroforese convencional em gel de agarose 2% do perfil de RAPD das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com o iniciador 1.

Linha 1 – *H. seropedicae* M2;

Linha 2 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 3 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA95;

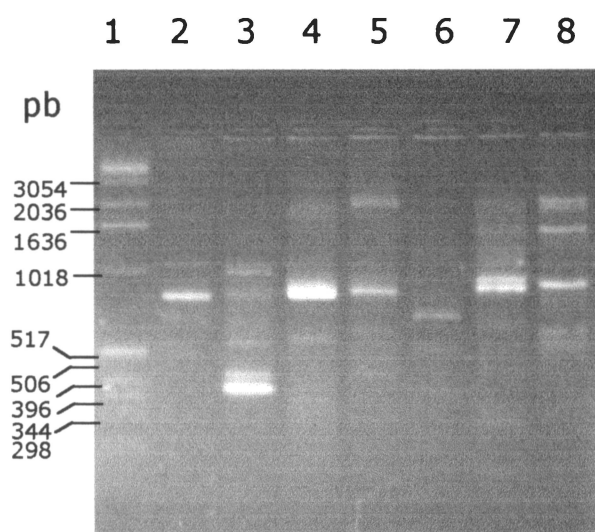
Linha 5 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 6 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 7 - *H. seropedicae* Z78;

Linha 8 – Marcador Molecular 1Kb ladder (Invitrogen).

**Figura 18** - Perfil de amplificação ao acaso de DNA das estirpes de *Herbaspirillum* com o iniciador 2.



Eletroforese convencional em gel de agarose 2% do perfil de RAPD das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com o iniciador 2.

Linha 1- Marcador Molecular 1Kb ladder (Invitrogen);

Linha 2 - *H. seropedicae* M2;

Linha 3 - *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 4 - *H. seropedicae* ZA69;

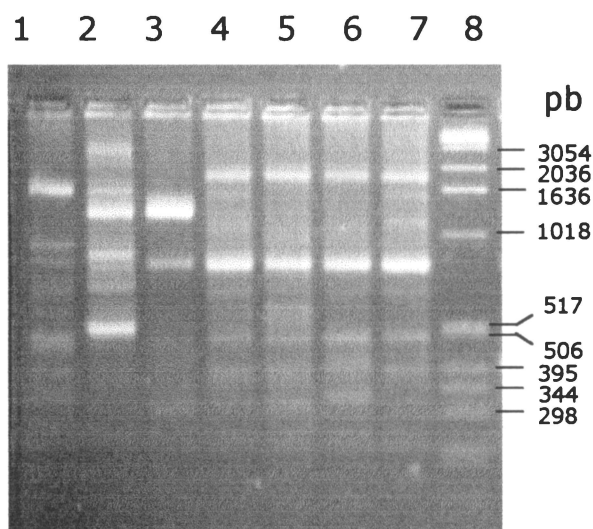
Linha 5 - *H. seropedicae* ZA95;

Linha 6 - *H. seropedicae* Z152;

Linha 7 - *H. seropedicae* Z67;

Linha 8 - *H. seropedicae* Z78.

**Figura 19** - Perfil de amplificação ao acaso de DNA das estirpes de *Herbaspirillum* com o iniciador 3.



Eletroforese convencional em gel de agarose 2% do perfil de RAPD das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com o iniciador 3.

Linha 1 – *H. seropedicae* M2;

Linha 2 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 3 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA95;

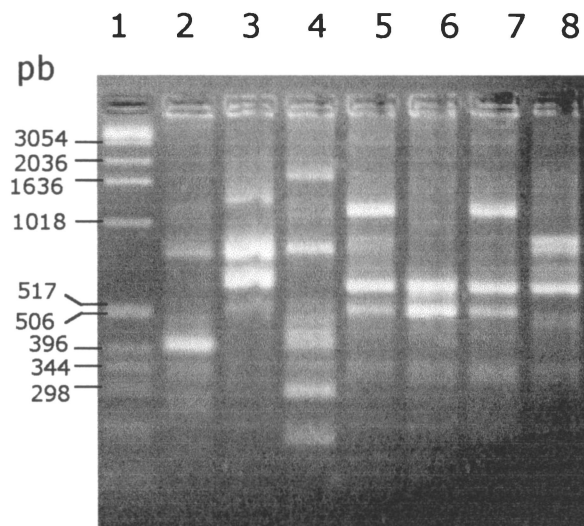
Linha 5 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 6 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 7 – *H. seropedicae* Z78;

Linha 8– Marcador Molecular 1Kb ladder (Invitrogen).

**Figura 20** - Perfil de amplificação ao acaso de DNA das estirpes de *Herbaspirillum* com o iniciador 4.



Eletroforese convencional em gel de agarose 2% do perfil de RAPD das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com o iniciador 4.

Linha 1- Marcador Molecular 1Kb ladder (Invitrogen);

Linha 2 - *H. seropedicae* M2;

Linha 3 - *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 4 - *H. seropedicae* ZA69;

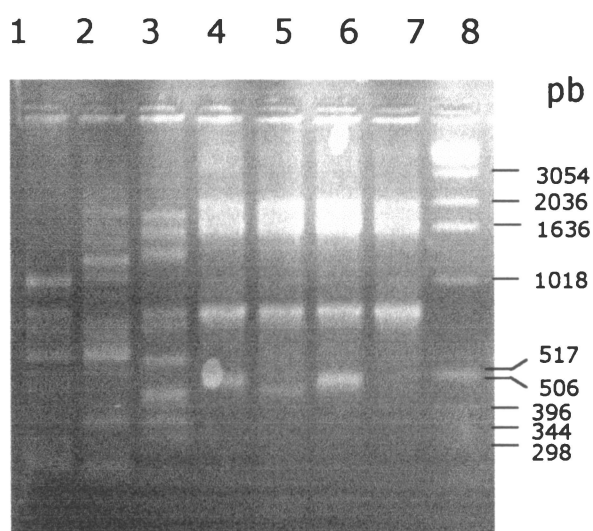
Linha 5 - *H. seropedicae* ZA95;

Linha 6 - *H. seropedicae* Z152;

Linha 7 - *H. seropedicae* Z67;

Linha 8 - *H. seropedicae* Z78.

**Figura 21** - Perfil de amplificação ao acaso de DNA das estirpes de *Herbaspirillum* com o iniciador 5.



Eletroforese convencional em gel de agarose 2% do perfil de RAPD das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com o iniciador 5.

Linha 1 – *H. seropedicae* M2;

Linha 2 – *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 3 – *H. seropedicae* ZA69;

Linha 4 – *H. seropedicae* ZA95;

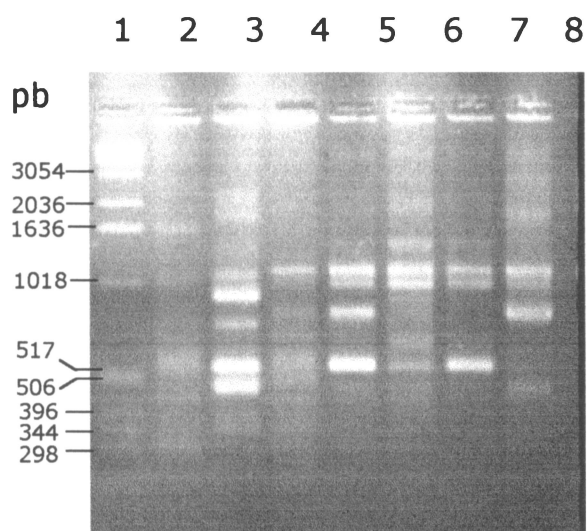
Linha 5 – *H. seropedicae* Z152;

Linha 6 – *H. seropedicae* Z67;

Linha 7 - *H. seropedicae* Z78;

Linha 8– Marcador Molecular 1Kb ladder (Invitrogen).

**Figura 22** - Perfil de amplificação ao acaso de DNA das estirpes de *Herbaspirillum* com o iniciador 6.



Eletroforese convencional em gel de agarose 2% do perfil de RAPD das estirpes de *Herbaspirillum* obtido com o iniciador 6.

Linha 1- Marcador Molecular 1Kb ladder (Invitrogen);

Linha 2 - *H. seropedicae* M2;

Linha 3 - *H. rubrisubalbicans* M4;

Linha 4 - *H. seropedicae* ZA69;

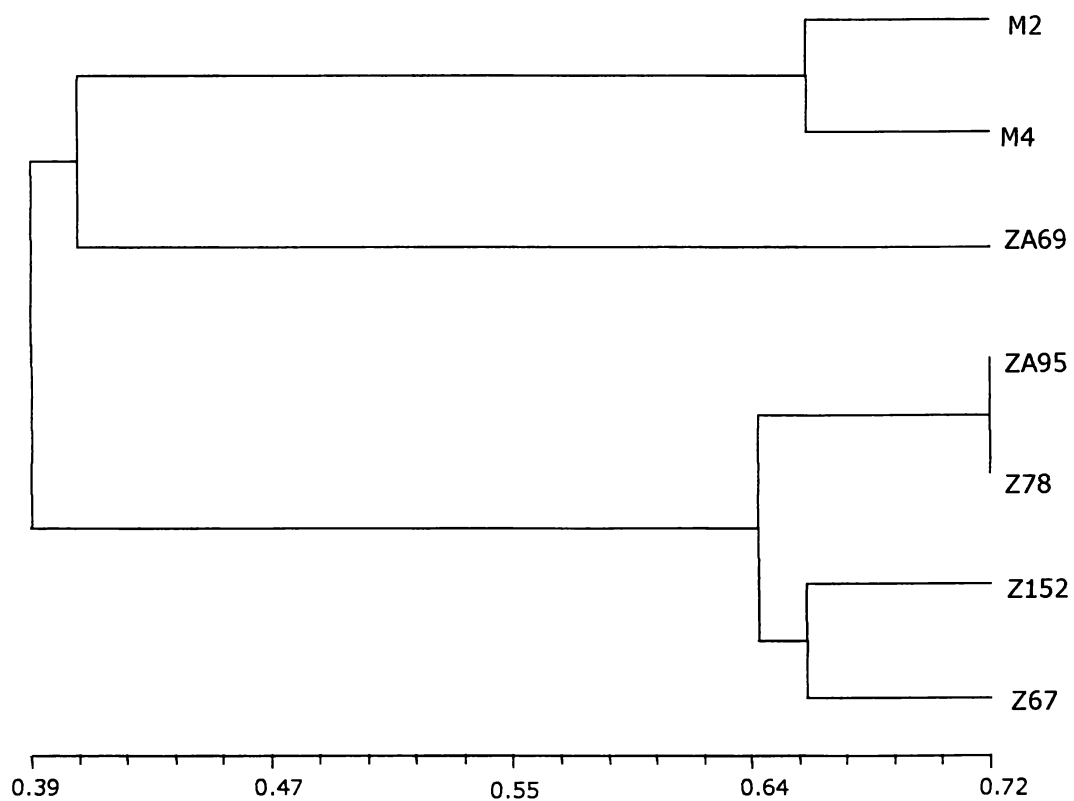
Linha 5 - *H. seropedicae* ZA95;

Linha 6 - *H. seropedicae* Z152;

Linha 7 - *H. seropedicae* Z67;

Linha 8 - *H. seropedicae* Z78.

**Figura 23** – Dendrograma das estirpes de *Herbaspirillum* construído a partir do perfil obtido por RAPD com seis iniciadores.



As similaridades foram calculadas usando o coeficiente de Dice (DICE, 1945) e as estirpes foram agrupadas pelo método UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958).

**Tabela 7** – Caracterização genotípica das estirpes de *Herbaspirillum* obtidas por perfis de PFGE, RAPD e RFLP, e análise das seqüências parciais do gene que codifica o 16S rRNA.

Organismo	Perfil de PFGE <sup>a</sup>	Perfil de RAPD <sup>b</sup>	Perfil de RFLP <sup>c</sup>	16S rRNA <sup>d</sup>
<i>H. seropedicae</i>				
M2	a	aaaaaa	aa	a
ZA69	b	cccccc	bb	b
ZA95	C	dddddd	cc	c
Z152	C	deeeee	cd	c
Z67	C	efffff	ce	c
Z78	c	fggggg	ce	c
<i>H. rubrisubalbicans</i>				
M4	a	bbbbbb	aa	a

<sup>a</sup> Perfil de PFGE obtido com a endonuclease *SwaI*. Cada letra define um padrão.

<sup>b</sup> Perfis de RAPD obtidos com diferentes iniciadores. Cada letra define um padrão para os iniciadores 1 a 6, respectivamente (Tabela 4).

<sup>c</sup> Perfis de RFLP obtidos por restrição do DNA genômico clivado com as endonucleases *HindIII* e *DraI*, respectivamente. Cada letra define um padrão.

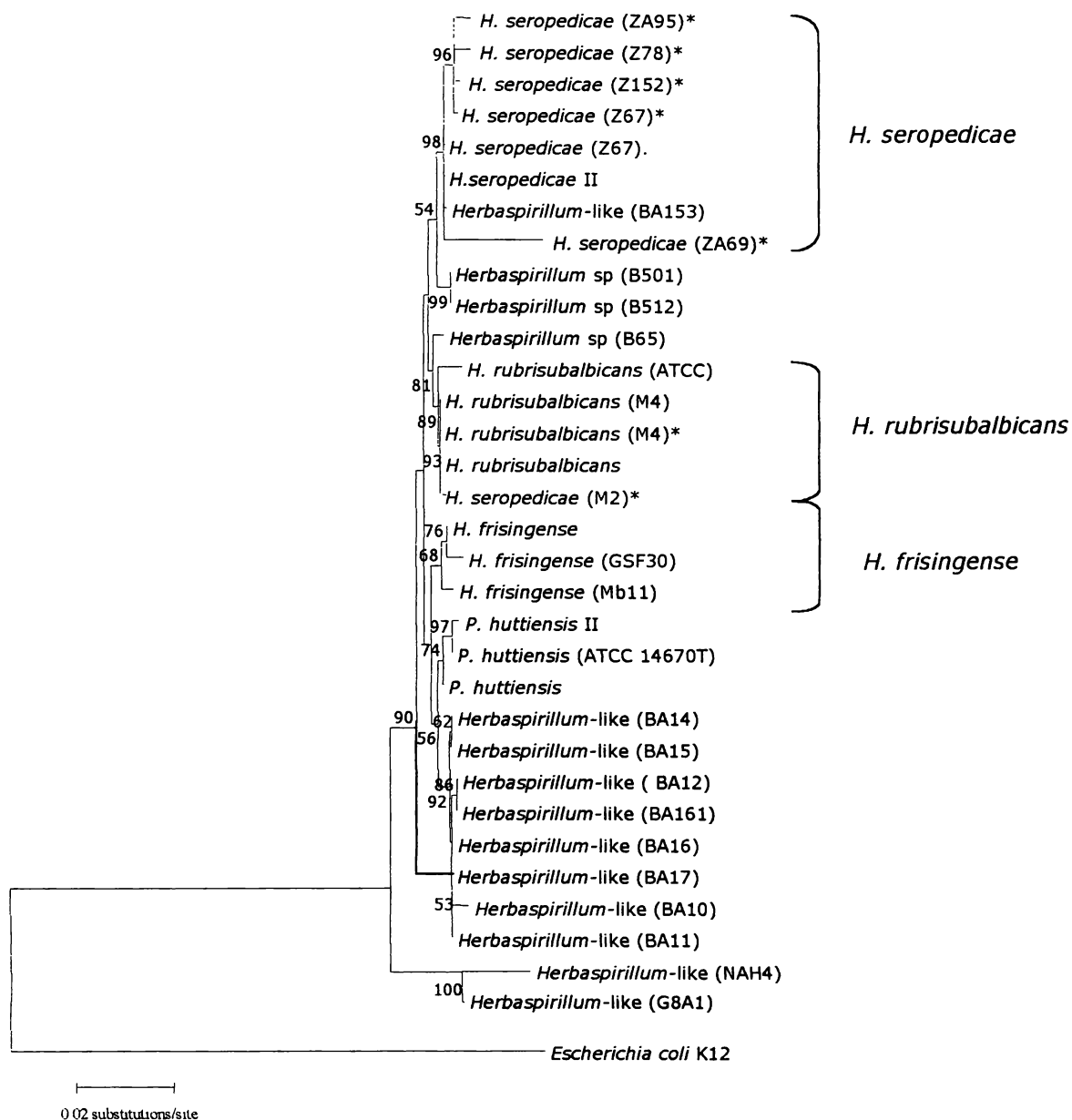
<sup>d</sup> A região Y1-Y3 do gene 16S rRNA é constituída por aproximadamente 1500 bp. As letras representam genótipos agrupados.

#### **4.7 - SEQUENCIAMENTO DO GENE QUE CODIFICA O 16S rRNA DAS ESTIRPES DE *Herbaspirillum***

A amplificação quase total do gene 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum* foi realizada utilizando os iniciadores Y1 e Y3, que anelam em regiões conservadas das extremidades 5' e 3' deste gene, respectivamente. O produto de amplificação resultante apresenta tamanho de aproximadamente 1,5 Kb e corresponde a 93,4% do gene que codifica o 16S rRNA de *Escherichia coli*. Os produtos da reação de PCR foram seqüenciados em ambas as direções, resultando na seqüência completa do fragmento Y1-Y3, com redundância de três vezes. Oitos iniciadores foram utilizados para sequenciar esta região do gene 16S rRNA: Y1, Y2, Y3, 16S362f, 16S786f, 16S1203f, 16S1110r e 16S805r. As seqüências destes iniciadores estão descritas na Tabela 4.

A amplificação do gene 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum* produziu seqüências de 1464 nucleotídeos para as estirpes M2 de *H. seropedicae*; de 1465 para M4 de *H. rubrisubalbicans*; de 1429 nucleotídeos para as estirpes ZA95, ZA152 e Z78 de *H. seropedicae*; de 1456 para estirpe ZA69; e de 1427pb para Z67 de *H. seropedicae*, excluindo as seqüências dos iniciadores. As seqüências das estirpes M2 (AY191276), ZA69 (AY191272), ZA95 (AY191274), Z152 (AY191273) e Z78 (AY191275) foram depositadas no Banco de dados GenBank, e seus números de acesso estão entre parênteses. A Figura 24 mostra a árvore filogenética construída utilizando todas as seqüências parciais do gene 16S rRNA disponíveis no banco de dados GenBank de organismos relacionados, pertencentes à subdivisão beta das proteobactérias, assim como as seqüências deste gene obtidas neste trabalho. O alinhamento destas seqüências encontra-se no apêndice 1.

**Figura 24** – Árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum* obtidas neste trabalho (\*) ou disponíveis no banco de dados GenBank.



A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining. Os valores de boot-strap foram calculados de 2000 árvores, e cada número presente nas ramificações indica a porcentagem de árvores nas quais estas ramificações foram suportadas. A barra representa o número de substituições por sítio.

A seqüência parcial do gene 16S rRNA da estirpe Z67 de *H. seropedicae* depositada no banco de dados GenBank (KIRCHHOOF *et al.*, 2001), foi diferente da seqüência obtida neste estudo em três bases. O gene 16S rRNA da estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans*, depositado no banco de dados GenBank (KIRCHHOOF *et al.*, 2001), foi idêntica a seqüência obtida para esta estirpe neste trabalho, e apresentou 9 nucleotídeos diferentes da estirpe M2. A seqüência do gene 16S rRNA de M2 ainda não havia sido obtida, e quando comparada a da estirpe Z67, diferiu em 15 bases. A seqüência do gene 16S rRNA da estirpe ZA69 apresentou maior divergência, apresentando deleções e inserções de nucleotídeos ao longo de toda a seqüência. As demais estirpes (ZA95, Z152, Z67 e Z78) apresentaram seqüências próximas, com poucas diferenças entre si. Apesar de não haver relatos na literatura onde valores de identidade entre seqüências do gene 16S rRNA sejam estabelecidos para determinação clara entre espécies ou grupos taxonômicos, a localização dos organismos em uma árvore filogenética inferida a partir das seqüências deste gene permite ter uma idéia da proximidade evolutiva e taxonômica entre os organismos comparados.

Estes resultados estão sumarizados na Tabela 8, onde a proporção de identidade entre as seqüências do gene 16S rRNA destas estirpes foi calculada.

Os resultados da análise das seqüências do gene 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum* estão de acordo com aqueles obtidos em todos os métodos utilizados (PFGE, RAPD e RFLP) localizando as estirpes estudadas em três grupos distintos: o grupo I inclui M2 e M4; grupo II, ZA69; e grupo III, ZA95, Z78, Z67 e Z152. A Tabela 8 mostra a caracterização genotípica obtida com os diferentes métodos avaliados.

**Tabela 8** - Matriz de proporção de identidade entre pares de seqüências do gene que codifica o 16S rRNA calculada a partir do alinhamento entre as seqüências das estirpes analisadas.

<b>Estirpe</b>	<b>M2</b>	<b>M4</b>	<b>ZA69</b>	<b>ZA95</b>	<b>Z152</b>	<b>Z67</b>	<b>Z78</b>
<b>M2</b>	1,000	0,998	0,963	0,986	0,990	0,989	0,988
<b>M4</b>	---	1,000	0,960	0,983	0,987	0,986	0,985
<b>ZA69</b>	---	---	1,000	0,963	0,966	0,965	0,964
<b>ZA95</b>	---	---	---	1,000	0,993	0,992	0,991
<b>Z152</b>	---	---	---	---	1,000	0,995	0,995
<b>Z67</b>	---	---	---	---	---	1,000	0,993
<b>Z78</b>	---	---	---	---	---	---	1,000

Matriz mostrando a proporção de identidade entre pares de seqüências de 16S rRNA calculada a partir do alinhamento das seqüências obtidas neste estudo. O alinhamento foi realizado pelo programa Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994) usando-se os parâmetros padrões.

## 5 – DISCUSSÃO

Técnicas de tipagem molecular utilizando marcadores ou seqüências de DNA ou de RNA apresentam alto poder discriminatório, e são muito utilizadas para caracterização e diferenciação de microrganismos. Só no ano passado, vários trabalhos de tipagem foram realizados. Estes métodos foram, por exemplo, utilizados com propósitos epidemiológicos para caracterizar estirpes de *Aspergillus fumigatus* (LASKER, 2002), *Burkholderia cepacia* (COENYE *et al.*, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (SPEERT, 2002; DAWSON *et al.*, 2002), *Mycobacterium tuberculosis* (KRUUNER *et al.*, 2002; MOKROUSOV, *et al.*, 2002); para diferenciação entre bactérias endofíticas como *Erwinia carotovora* (REITER *et al.*, 2002); para diferenciação de estirpes de *Streptococcus thermophilus* (MORA *et al.*, 2002); para estudos de bactérias com importância agrônômica, como linhagens de *Bacillus subtilis* (SARKAR *et al.*, 2002); para caracterização de leveduras relacionadas à fermentação de vinhos, tais como *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisiae* (CARUSO, *et al.*, 2002). Estes trabalhos tiveram como objetivo diferenciar e classificar de forma mais clara espécies e estirpes relacionadas.

Neste estudo foram avaliadas as estirpes M2, ZA69, ZA95, Z152, Z67 e Z78 de *H. seropedicae* e a estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans*, com o objetivo de definir relações inter e intra-específicas utilizando métodos moleculares, ao invés de características fenotípicas.

A caracterização e diversidade genética destas estirpes foi investigada utilizando as seguintes técnicas moleculares: eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo do comprimento de fragmentos de DNA por restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e sequenciamento parcial do gene que codifica o 16S rRNA das estirpes estudadas.

Os resultados de eletroforese em campo pulsado de DNA total intacto mostraram que *H. seropedicae* Z78 possui um único cromossomo circular. Os cromossomos das outras estirpes de *Herbaspirillum* avaliadas neste estudo também são circulares já que, quando intactos, não migraram no gel de eletroforese em campo pulsado sob as condições de eletroforese utilizadas (Figura 7). Uma vez que os resultados obtidos com DNA digerido das estirpes estudadas indicam um tamanho de genoma semelhantes, é provável que todas as estirpes estudadas apresentem um único cromossomo circular.

Para a estimativa do tamanho do cromossomo de *H. seropedicae* Z78, o DNA foi linearizado por digestão parcial com a enzima *SalI* e submetido à eletroforese. O tamanho estimado foi de 5,8 milhões de pares de bases. A digestão de DNA intacto de *H. seropedicae* Z78 com enzimas de restrição de corte raro também permitiu estimar o tamanho do genoma. Devido ao alto grau de G+C no genoma de *Herbaspirillum*,  $67 \pm 0,5 \text{ mol\%}$  (BALDANI *et al.*, 1986), as endonucleases de corte raro escolhidas para este estudo apresentam alto teor de A+T em seus sítios de reconhecimento (Tabela 2). A clivagem do DNA genômico de *Herbaspirillum* com estas enzimas resulta em um pequeno número de bandas, uma vez que estes sítios de reconhecimento ricos em A+T encontram-se sub-representados num genoma com alta porcentagem de C+G. Desde que os fragmentos de DNA gerados por estas enzimas apresentam grande variação quanto ao tamanho, as condições de eletroforese em campo pulsado variaram de acordo com a faixa de tamanho a ser resolvida, e foram descritas nas legendas das Figuras.

Os tamanhos dos fragmentos de DNA resultantes em cada perfil foram determinados por comparação com três diferentes padrões moleculares, permitindo uma estimativa dos tamanhos destas bandas. O eletroforetograma representado na Figura 3 foi capaz de

definir os fragmentos de DNA numa faixa de tamanho de aproximadamente 150 a 2000Kb, apesar de apresentar algumas bandas comprimidas. A Figura 4 mostrou uma eletroforese com boa definição dos fragmentos de menor tamanho molecular (até aproximadamente 400Kb), mas para bandas maiores, a separação foi ineficiente. A somatória das médias dos tamanhos dos fragmentos gerados pelas enzimas *Swa*I e *Pac*I foi 5.511.000 e 6.108.000 pb, respectivamente. Estes valores estão de acordo com aqueles obtidos pelo perfil de migração do DNA total de *H. seropedicae* Z78 digerido em um único ponto.

O gene que codifica o 16S rRNA tem sido amplamente utilizado como marcador genético em estudos de filogenia (WOESE, 1987). O número de operons contendo o 16S rRNA (operon *rrn*) observados em bactérias varia, sendo que alguns organismos apresentam apenas uma cópia deste operon, enquanto outros contém 15 cópias (KLAPPENBACH *et al.*, 2001). Na grande maioria das espécies estudadas o operon ribossômico, independentemente do número de cópias presentes, apresenta quantidades equimolares dos genes 5, 16 e 23S rRNA e são transcritos de uma maneira coordenada (KLAPPENBACH *et al.*, 2001). Algumas vezes o operon *rrn* contém genes que codificam para tRNA.

Não existem evidências que relacionem o número de operons *rrn* presentes em bactérias a alguma implicação evolucionária ou ecológica (KLAPPENBACH *et al.*, 2001), apesar de alguns autores sugerirem que o número de operons pode estar relacionado à velocidade de crescimento e a capacidade de adaptação bacteriana a mudanças nas condições ambientais (FEGATELLA *et al.*, 1998; ELSER *et al.*, 2000).

Nos experimentos de hibridização do DNA genômico com uma sonda contendo o gene que codifica o 16S rRNA, o número de sinais positivos para este gene nos cromossomas de todas as estirpes foi

igual nos perfis de restrição digeridos com as enzimas *HindIII* (3 bandas) e *DraI* (1 banda). Estes resultados sugerem que as estirpes de *Herbaspirillum* possuem, pelo menos, 3 cópias do gene que codifica o 16S rRNA. Os perfis de hibridização do DNA genômico de *H. seropedicae* Z78, digerido com endonucleases de corte raro, com uma sonda contendo o gene que codifica o 16S rRNA mostrou que 5 bandas são visualizadas com a enzima *SwaI*. Os resultados de clivagem do DNA total com enzima de corte raro são mais discriminatórios indicando, portanto, que *H. seropedicae* Z78 possui cinco cópias do gene que codifica o 16S rRNA.

Os resultados de comparação entre os organismos obtidos pela utilização da técnica RFLP mostraram baixa capacidade discriminatória, uma vez que somente a estirpe ZA69 apresentou um perfil eletroforético distinto das demais estirpes, com ambas enzimas utilizadas (*HindIII* e *DraI*). Padrões eletroforéticos idênticos foram obtidos para os grupos M2/M4, assim como para as estirpes Z67 e Z78. As estirpes ZA95 e Z152 diferenciaram-se apenas por duas bandas, quando a endonuclease *HindIII* foi utilizada. Entretanto, estes resultados permitiram a construção de um dendrograma, onde as estirpes foram divididas em três grupos principais. Estes grupos foram idênticos àqueles três formados quando foram utilizados os resultados de PFGE.

Os dados gerados pelo método RAPD mostraram um maior nível de variabilidade entre as estirpes, embora, da mesma forma que os resultados dos ensaios de RFLP, o dendrograma construído a partir dos perfis obtidos por RAPD dividiram as sete estirpes de *Herbaspirillum* em três grupos principais, com nível de similaridade de 39% entre eles. O grupo I foi formado pelas estirpes M2 e M4, com nível de similaridade de 65%. Com exceção do iniciador 1, todos os outros iniciadores resultaram em padrões de amplificação diferentes entre estas duas estirpes, possibilitando uma diferenciação

confiável entre M2 e M4. A linhagem ZA69 de *H. seropedicae* foi inserida no grupo II, próximo ao grupo I, apresentando similaridade de 40%. As demais linhagens, ZA95, Z78, Z152 e Z67, formaram um segundo grupo principal, com coeficiente de similaridade de 64% entre os dois sub-grupos (ZA95/Z78 e Z152/Z67).

Além disso, os perfis obtidos pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) foram mais facilmente interpretados em relação àqueles perfis gerados por polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). Estes resultados indicam que o RAPD foi o método mais sensível utilizado neste estudo para diferenciar as estirpes de *Herbaspirillum*. Entretanto, a reprodutibilidade desta metodologia é algumas vezes questionada, o que poderia reduzir seu potencial de aplicação (PENNER *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993). Neste trabalho, este efeito foi minimizado utilizando sempre o mesmo termociclador e um sistema de RAPD comercialmente disponível, com componentes e condições padronizados, com resultados confiáveis e reprodutíveis. Além disto, o sistema utilizado para os ensaios (Ready.To.Go™, Amersham Biosciences) apresenta-se sob forma de "beads", reduzindo significativamente o número de manipulações necessárias para obtenção dos resultados, aumentando a reprodutibilidade da técnica de RAPD. Os ensaios foram repetidos três vezes e todos os resultados obtidos foram idênticos.

LASKER (2000) relataram recentemente que experimentos independentes de amplificação utilizando a mesma preparação de DNA ou diferentes preparações de DNA da mesma estirpe de *Aspergillus fumigatus* produziram resultados altamente reprodutíveis, utilizando as seguintes técnicas: RFLP, RAPD, análises por SSDP ("sequence-specific DNA primer"), ou PMM ("polymorphic microsatellite markers"). CONEY *et al.* (2002) chegaram à mesma conclusão analisando o genoma de isolados de *Burkholderia cepacia*

Genomovar III por PFGE, "BOX-PCR fingerprinting" e tipagem por RAPD.

Ainda em relação à comparação entre metodologias, ZHANG *et al.* (2002) demonstraram que a tipagem por RAPD é útil na rápida caracterização de *Streptococci* grupo B, além de ter sido considerada pelos autores como mais discriminatória que ensaios sorológicos convencionais para distinguir estes microrganismos. Os resultados apresentados por estes autores, demonstram que a técnica de RAPD pode também ser mais discriminatória quando comparada a diversas outras técnicas de tipagem e reforçam as conclusões obtidas neste estudo, onde RAPD apresentou resultados consistentes e reproduzíveis, permitindo uma diferenciação entre todas as estirpes analisadas.

CRUZ *et al.* (2001) avaliaram a relação filogenética entre várias estirpes de *Herbaspirillum* e de organismos relacionados. Estes autores utilizaram o sequenciamento parcial do gene que codifica o 16S rRNA e análise de restrição do DNA ribossômico amplificado [ARDRA] para definir o posicionamento filogenético destes organismos. As estirpes M2 e Z67 de *H. seropedicae* e M4 de *H. rubrisubalbicans* apresentaram o mesmo padrão de restrição do gene que codifica o 16S rRNA, quando as endonucleases *Sau3A*, *HaeIII* e *RsaI* foram utilizadas. Somente a enzima de restrição *AluI* foi capaz de diferenciar todas as estirpes (CRUZ *et al.*, 2001). O sequenciamento de um fragmento de cerca de 300pb do gene que codifica o 16S rRNA de *H. seropedicae* Z67 e *H. rubrisubalbicans* M4 também reuniu as duas espécies em grupos intimamente relacionados (CRUZ *et al.*, 2001). Apesar de M2 e M4 pertencerem a diferentes espécies, como demonstrado por ensaios fisiológicos e de hibridização DNA-DNA (BALDANI *et al.*, 1996), as análises realizadas neste estudo demonstraram uma grande proximidade genética entre estas duas bactérias. Esta observação foi discutida também por Cruz

*et al.* (2001) e enfatiza a baixa diferenciação destes organismos. CABALLERO-MELADO & MARTINEZ ROMERO (1994) e KIRCHHOF *et al.* (2001), estudando estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *H. frisingense*, chegaram à mesma conclusão, demonstrando que estes organismos pertencem a grupos geneticamente muito relacionados e apresentam baixa variabilidade. Por se tratar de um gênero representado por organismos endofíticos, diazotróficos, com baixa taxa de sobrevivência em solos não cultivados (BALDANI *et al.*, 1992), *Herbaspirillum* spp. demonstra ser uma bactéria bem adaptada ao seu estado endofítico. McARTHUR *et al.* (1988) sugerem que uma pequena variabilidade genética entre organismos, pode ser resultado de uma adaptação a um "habitat" natural muito estável, durante um longo período de tempo.

O sequenciamento dos operons ribossômicos é de relevância conhecida nos estudos de evolução e filogenia bacteriana (WOESE, 1987). O sequenciamento do gene que codifica o 16S rRNA tem sido particularmente utilizado para reconstrução de relações filogenéticas entre organismos (GUTELL *et al.*, 1994; LUZ *et al.*, 1998). A análise filogenética da seqüência parcial do gene que codifica o 16S rRNA das estirpes de *Herbaspirillum* obtidas neste estudo e seqüências de organismos filogeneticamente relacionados depositadas no banco de dados GenBank Database (Figura 24), posicionou as espécies de *Herbaspirillum* (*H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingensis*), isolados semelhantes a *Herbaspirillum* e a espécie relacionada *Pseudomonas huttiensis* em ramos separados bem suportados por valores de "bootstrap". As estirpes Z67, Z78, ZA95 e Z152 foram posicionadas na ramificação de *H. seropedicae*, formando um grupo próximo de organismos com valor de "bootstrap" de 96. A estirpe ZA69 foi inserida em um grupo separado das outras estirpes, com coeficiente de identidade de 96%, demonstrando uma íntima relação filogenética entre elas e consistente com sua posição taxonômica.

Entretanto, as estirpes M2 de *H. seropedicae* e M4 de *H. rubrisubalbicans* apresentaram seqüências de 16S rRNA muito semelhantes, diferindo em apenas oito nucleotídeos, sendo agrupadas na ramificação de *H. rubrisubalbicans*. A estirpe ZA69 encontra-se menos próxima das demais, apresentando identidades que variam de 96% em relação a M4 e de 96,6%, quando comparada a Z152. As demais estirpes de *H. seropedicae*, ZA95, Z152, Z67 e Z78, possuem íntima relação entre si, apresentando identidade de 99,1% entre ZA95 e Z78 a 99,5%, entre Z152, Z67 e Z78.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por PFGE, RFLP e RAPD e, embora existam diferenças no posicionamento relativo destas estirpes dentro dos grupos obtidos por estas três metodologias, o padrão geral de agrupamento das estirpes foi conservado.

Em resumo, as ferramentas moleculares analisando a seqüência do gene que codifica o 16S rRNA ou o genoma inteiro (PFGE, RFLP e RAPD) permitiram a diferenciação entre as sete estirpes de *Herbaspirillum* estudadas. Os resultados obtidos por RAPD utilizando sistema comercialmente disponível foram os mais discriminatórios e permitiram uma diferenciação mais confiável entre todas as estirpes testadas. Estes resultados estão de acordo com o fato de que as seqüências do gene que codifica o 16S rRNA são muito conservadas entre organismos da mesma espécie, sendo esta metodologia potencialmente mais útil na comparação entre organismos que não apresentem uma relação filogenética muito próxima (WOESE, 1987). Em contraste, RAPD utiliza como molde para amplificação o DNA genômico total sendo, portanto, potencialmente capaz de detectar diferenças mesmo entre organismos muito próximos.

## 6 – CONCLUSÕES

O cromossoma de *H. seropedicae* Z78 é constituído por apenas uma molécula de DNA circular, com tamanho de aproximadamente 6000Kb.

As demais estirpes de *H. seropedicae* M2, ZA69, ZA95, Z152, Z67, assim como a estirpe M4 de *H. rubrisubalbicans*, também apresentam DNA genômico circular.

Os métodos de eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA utilizados para diferenciação entre as estirpes neste trabalho demonstraram bastante consistência, definindo três grupos para as estirpes: M2 e M4 foram inseridas no Grupo I, ZA69 foi posicionada em um grupo separado das demais estirpes, Grupo II, e o Grupo III englobou todas as demais estirpes, Z95, Z152, Z67 e Z78, independente do método de tipagem utilizado.

Os resultados obtidos nos ensaios de hibridização do DNA genômico das estirpes de *Herbaspirillum* com o gene que codifica o 16S rRNA sugerem que estas estirpes possuem de quatro a cinco cópias deste gene, como demonstrado por PFGE.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARDET-SERVENT, A.; MICHAUX-CHARACHON, S.; JUMAS-BILAK, E.; KARAYAN, L.; RAMUZ, M. 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. **J. Bacteriol.** 175:7869-7874.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25:3389-3402.

ARBEIT, R.D. 1995. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. *In*: P.R. MURRAY, E.J. BARON, M.A. PFALLER, F.C. TENOVER and R.H. YOLKER (eds), **Manual of Clinical Microbiology**, 6<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C. pp.190-208.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen., nov. sp. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 36:86-93.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis.** 13: 65-73.

BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. 1995. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with <sup>15</sup>N-labelled fertilizer. *In*: International Symposium on

Sustainable Agriculture for the tropics: The role of Biological Nitrogen Fixation, Angra dos Reis, Rio de Janeiro. p202.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 46:802-810.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil. Biol. Biochem.** 29:911-922.

BALDANI, J.I.; OLIVEIRA, A.L.M.; GUIMARAES, S.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS Jr., F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. 1999. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. *In*: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12<sup>th</sup>, Foz do Iguaçu. **Proceedings of the International Congress on Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 2000. pp.397-400.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regul.** 24:7-11.

BERRY, A.M.; HARRIOTT, O.T.; MOREAU, R.A.; OSMAN, S.F.; BENSON, D.R.; JONES, A.D. 1993. Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90:6091-6094.

BIRREN, B. & LAI, E. Pulsed Field Gel Electrophoresis. A practical guide. **Academic Press, Inc.** 1993.

BODDEY, R.M. 1995. Biological nitrogen fixation in sugar cane: a key to energetically viable biofuel production. **Crit. Rev. Plant. Sci.** 14:263-279.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil.** 174:195-209.

BOTHE, H.; YATES, M.G.; CANNON, F.C. II.1. 1983. Physiology, biochemistry and genetics of dinitrogen fixation. *In: Inorganic Plant Nutrition, In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, v15.* Ed. Lauchli and R. L. Bielecki, New York Tokio.

BREMER, H. & DENNIS, P.P. 1996. *In: Neidhardt, F.C.; Curtiss, R. III., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C.; Low, K.B. et al. (eds). Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology.* American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1553-1569.

BURNS, R.C. & HARDY, K.W. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Berlin:Springer-Verlag.

BUSSE, H.J.; DENNER, E.B.M.; LUBITZ, W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **J. Biotechnol.** 47:3-38.

CABALLERO-MELLADO, J. & MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. 1994. **Appl. Environ. Microbiol.** 60:1532-1537.

CAETANO-ANÓLLES, G.; BASSAN, B.J.; GRESSHOFF, P.M. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology (NY)**. 9:553-557.

CARLE, G.F. & OLSON, M.V. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res.** 12:5647-5664.

CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. 1986. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**. 232:65-68.

CARLSON, C. R.; JOHANSEN, T.; LECADET, M.; KOSTO, A. 1996. Genomic organization of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp *Berliner* 1715. **Mol. Microbiol.** 142:1625-1634.

CARUSO, M.; CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. 2002. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. **Lett. Appl. Microbiol.** 5:323-328.

CASJENS, S. & HUANG, W. Linear chromosomal physical and genetic map of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. 1993. **Mol. Microbiol.** 8:967-980.

CASJENS, S. 1998. The diverse and dynamic structure of bacterial genomes. **Annu. Rev. Genet.** 32:339-377.

CASJENS, S. 2000. *Borrelia* genomes in the year 2000. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** 4:401-410.

CHEN, C. W. 1996. Complications and implications of linear bacterial chromosomes. **Trends Genet.** 12:192-196.

CHENG, H. P. & LESSIE, T. G. 1994. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. **J. Bacteriol.** 176:4034-4042.

CHOUDHARY, M., MACKENZIE, C., NERENG, K., SODERGREN, E., WEINSTOCK, G., KAPLAN, S. 1997. Low-resolution sequencing of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1<sup>T</sup>: Chromosome II is a true chromosome. **Microbiology.** 143:3085-3099.

CHU, G. 1986. Pulsed field electrophoresis in contour-clamped homogeneous electric fields for the resolution of DNA by size or topology. **Electrophoresis.** 10:290-295.

COENYE, T.; SPILKER, T.; MARTIN, A.; LIPUMA, J.J. 2002. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* Genomovar III. **J. Clin. Microbiol.** 9:3300-3307.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DELVIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; BARREL, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**. 393:537-544.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Appl. Environ. Microbiol.** 67:2375-2379.

CZAIJKA, J.; BSAT, N.; PIANI, M.; RUSS, W.; SULTANA, K.; WIEDMANN, M.; WHITAKER, R.; BATT, C.A. 1993. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphism. **Appl. Environ. Microbiol.** 59:304-308.

DAVIDSON, B.E.; MACDOUGALL, J.; SAINT GIRONS, I. 1992. Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. **J. Bacteriol.** 174:3766-3774.

DAWSON, S.L.; FRY, J.C.; DANCER, B.N. 2002. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent *Pseudomonas*. **J. Microbiol. Methods**. 1:9-22.

DICE, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**. 26:297-302.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. 1958. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**. 1:261-272.

DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F.O. 1987. The genus *Azospirillum*. In: **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Science Tech. Publishers, 155p.

DÖBEREINER, J. 1991. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A.; TRIIPER, H.G.; DOWRKIN, M.; HARDER, W. (eds). **The Prokariotes**. Berlin: Springer Verlag, pp 2236-2253.

DÖBEREINER, J. 1992. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 44:310-313.

DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F.L. 1993. Endophytic diazotrophs in sugar cane, tuber plants and cereals. In: R. PALÁCIOS R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., (eds). **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 671-676.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. 1994. Endophytic diazotrophs: The key to BFN in gramineous plants. In: **Nitrogen Fixation with Non-legumes**. HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. (eds). Am. Univ. in Cairo Press, Cairo, Egypt. pp.395-408.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. 1995. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa: Embrapa SPI.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.B.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES, R. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugar cane stems. **Plant Physiol.** 105:1139-1147.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. **Appl. Environ. Microbiol.** 67:5285-5293.

ELSER, J.J.; STERN, R.W.; GOROKHOVA, E.; FAGAN, W.F.; MARKOW, T.A.; COTNER, J.B.; HARRISON, J.F.; HOBBIIE, S.E.; ODELL, G.M.; WEIDER, L.J. Biological stoichiometry from genes to ecosystems. 2000. **Ecol. Lett.** 3:540-550.

ESTRADA, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. 2002. A N<sup>2</sup>-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Can. J. Microbiol.** 48: 285-294

FEGALTELLA, F.; LIM, J.; KJELLEBERG, S.; CAVICCHIOLI, R. 1998. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:4433-4438.

FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.** 137:266-267.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. pp.220.

FRASER, C.M.; GOCAYANE, J.D.; WHITE, O.; ADAMS, M.D.; CLAYTON, R.A, FLEISCHMANN, R.D.; BULT, C.J.; KERLAVAGE, A.R.; SUTTON, G.; KELLEY, J.M.; *et al.* 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science.** 270:397-403.

FRASER, C.M.; CASJENS, S.; HUANG, W.M.; SUTTON, G.G.; CLAYTON, R.; LATHIGRA, R.; WHITE, O.; KETCHUM, K.A.; DODSON, R.; HICKEY, E.K.; GWINN, M.; DOUGHERTY, B.; TOMB, J.F.; FLEISCHMANN, R.D.; RICHARDSON, D.; PETERSON, J.; KERLAVAGE, A.R.; QUACKENBUSH, J.; SALZBERG, S.; HANSON, M.; VAN VUGT, R.; PALMER, N.; ADAMS, M.D.; GOCAYNE, J.; VENTER, J.C.; *et al.* 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature.** 11:580-586.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMINEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid-producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. **Plant and Soil.** 154:145-150.

GARDINER, K.; LASS, W.; PATTERSON, D. 1986. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using pulsed field gradient gel electrophoresis. **Somatic Cell Mol. Genet.** 12:185-195.

GARDINER, K. & PATTERSON, D. 1988. Transverse alternating electrophoresis. **Nature**. 331:371-372.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. 1990. Taxonomic relationships between [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF GROUP 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] *authrotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. (eds). **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Acad. Publish. p 293-294.

GERNER-SMIDT, P. 1992. Ribotyping of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J. Clin. Microbiol.** 30:2680-2685.

GUTELL, R.R.; LARSEN, N.; WOESE, C.R. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. **Microbiol. Rev.** 58:10-26.

HALL, T.A. **BioEdit 4.8**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5Mb); Disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** 43:895-914.

HARTMANN, A.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; OLIVARES, F.L.; WEBER, O.; REIS, V.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; SCHLOTTER, M.; KIRCHHOOF, G. 1999. Molecular approaches for the investigation of the diversity and localization of diazotrophic bacteria. In: NITROGEN

FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12<sup>th</sup>, Foz do Iguaçu. **Proceedings of the International Congress on Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 2000. p 411-412.

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; PIRKL, E.; LI, B.C.; HERRMANN, R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.** 24:4420-4449.

HONEYCUTT, R. J.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. 1993. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. **J. Bacteriol.** 175:6945-6952.

HOOD, D. W. PFGE in the study of a bacterial pathogen (*Haemophilus influenzae*). 1995. In: **Pulsed Field Gel Electrophoresis**. A Pratical Approach. The Pratical Approach Series.

HUANG, X.A. 1992. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics** 14:18-25.

JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Bot.** 45:757-766.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. 1997. *Herbaspirillum* an endophytic diazotroph colonizing vascular tissues in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **J. Exp. Bot.** 48:785-797.

JUMAS-BILAK, E.; MAUGARD, C.; MICHAUX-CHARACHON, S.; ALLARDET-SERVENT, A.; PERIN, A.; O'CALLAGHAN, D.; RAMUZ, M. 1995. Study of the organization of the genomes of *Escherichia coli*,

*Brucella melitensis* and *Agrobacterium tumefaciens* by insertion of a unique restriction site. **Microbiology**. 141:2425-2432.

JUMAS-BILAK, E.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; CALLAGHAN, D.; RAMUZ, M. 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. **Mol. Microbiol.** 27:99-106.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. 1997. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.** 29:853-862.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 1:157-168.

KLAPPENBACH, J. A.; SAXMAN, P. R.; COLE, J. R.; SCHMIDT, T. M. 2001. *rrndb*: the ribosomal RNA operon copy number database. **Nucleic Acids Res.** 29: 181-184.

KLASSEN, G., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U. 1997. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.** 43: 887-891.

KLOEPPER, J.W. & BEAUCHAMP, C.J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plants roots by bacteria. **Can. J. Microbiol.** 38:1219-1232.

KOLSTO, A.B. 1997. Dynamics bacterial genome organization. **Mol. Microbiol.** 24:241-248.

KOOPMAN, M.B.H.; KASBOHER, A.; BECKMANN, G.; van der ZEIJST, B.A.M.; KUSTERS, J.G. 1993. Genetic similarity of intestinal spirochetes from humans and various animal species. **J. Clin. Microbiol.** 31:753-759.

KOZINSKA, A.; FIGUERAS, M.J.; CHACON, M.R.; SOLER, L. 2002. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas genomospecies* isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **J. Appl. Microbiol.** 93: 1034-1041.

KRUUNER, A.; PEHME, L.; GHEBREMICHAEL, S.; KOIVULA, T.; HOFFNER, S.E.; MIKELSAAR, M. 2002. Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Infect. Dis.** 2:146-155.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. 2001. Mega 2: molecular evolutionary genetic analysis software. **Bioinformatics.** 17:1244-1245.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A.M.; ALLONI, G.; AZEVEDO, V.; BERTERO, M.G.; BESSIERES, P.; BOLOTIN, A.; BORCHERT, S.; BORRISS, R.; BOURSIER, L.; BRANS, A.; BRAUN, M.; BRIGNELL, S.C.; BRON, S.; BROUILLET, S.; BRUSCHI, C.V.; CALDWELL, B.; CAPUANO, V.; CARTER, N.M.; CHOI, S.K.; CODANI, J.J.; CONNERTON, I.F.; DANCHIN, A. *et al.* 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature.** 20:249-256.

LASKER, B.A. 2002. Evaluation of Performance of Four Genotypic Methods for Studying the Genetic Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* Isolates. **J. Clin. Microbiol.** 8:2886-2892.

LEE, J.S.; BIRREN, B.; LAI, E. 1996. Introduction to pulsed-field gels and preparation and analysis of large DNA. *In: Nonmammalian Genomic Analysis-A practical Guide.* BIRREN, B. and LAI, E. (eds) Academic Press, California, USA. p.1-24.

LESSIE, T. G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B. D.; DEVEREUX, R. 1996. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiol. Lett.** 144:117-128.

LEWIN, B. *In: Genes.* New York, John Wiley, 1997, 715p.

LUCHANSKY, J. B.; GLASS, K. A.; HARSONO, K. D.; DEGNAN, A J.; FAITH, N. G.; CAUVIN, B.; BACCUS-TAYLOR, G.; ARIHARA, K.; BATER, B., MAURER, A.J.; *et al.* 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:3053-3059.

LUZ, S.P.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; LAN, R.; REEVES, P.R. 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. **J. Bacteriol.** 180:2144-2151.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. 1982. **Molecular cloning: A laboratory manual.** New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MARTIN-DIDONET, C.C.G.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; KLEINA, M.; REGO, F.G.M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. 2000. Genome structure of the genus *Azospirillum*. **J. Bacteriol.** 182:4113-4116.

McARTHUR, J.V.; KOVACIC, D.A.; SMITH, M.H. 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 85:9621-9624.

MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** 144: 373-379.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFINA, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K. *et al.* 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis.* 20:1790-1799

MICHAUX, S.; PAILLISSON, J.; CARLES-NURIT, M. J., BOURG, G., ALLARDET-SERVENT, A., RAMUZ, M. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. **J. Bacteriol.** 175:701-705.

MILLS, D.; McCLUSKEY, K. 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi. The new cytology. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 3:351-357.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; OTTEN, T.; LIMESCHENKO, E.; STEKLOVA, L.; VYSHNEVSKIY, B. 2002. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium*

*tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 5:1417-1424.

MORA, D.; FORTINA, M.G.; PARINI, C.; RICCI, G.; GATTI, M.; GIRAFFA, G.; MANACHINI, P.L. 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. **J. Appl. Microbiol.** 2:278-287

MOREL, V. 1997. Bacteria diversity through warfare. **Science.** 278: 575.

MORENO, E. 1998. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? **FEMS Microbiol. Rev.** 22:255-275.

MEYERS, L.E.; SILVA, S.V.P.S.; PROCUNIR, J.D.; LITTLE, P.B. 1993. Genomic fingerprinting of *Haemophilus sommus* isolates using a random-amplified polymorphic DNA assay. **J. Clin. Microbiol.** 31: 512-517.

NEUMANN, B.; POSPIECH, A.; SCHAIRER, H.U. 1992. Size and stability of the genomes of the Myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. **J. Bacteriol.** 174:6307-6310.

NEWTON, W.E. 1999. Nitrogen fixation in perspective. In: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12<sup>th</sup>, Foz do Iguaçu. **Proceedings of the International Congress on Nitrogen Fixation.** Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 2000. P.3-8.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs

*Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils.** 21:197-200.

OLIVE, D. M. & BEAN, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.** 37: 1661-1669.

OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J.; PACE, N.R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Ann. Ver. Microbiol.** 40:337-365.

PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J.; FEDAK, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *In*: FERREIRA, M.E. AND GRATTAPAGLIA (eds). PCR methods and applications Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 341-345.

POSTGATE, J.R. 1982. Prospects for the exploitation of biological nitrogen fixation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** 290:143-147.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Appl. Environ. Microbiol.** 5:2261-2268.

RODLEY, P. D., RÖMLING, U.; TÜMMLER, B. 1995. A physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. **Mol Microbiol.** 17:57-67.

RONCATO-MACCARI, L.D,B; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. 2003. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**. 35:261-270.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SARKAR, P.K.; HASENACK, B.; NOUT, M.J. 2002. Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (*Indian Kinema*) and locust beans (*African Soumbala*). **Int J Food Microbiol**. 3:175-186.

SAULNIER, P.; BOURNEIX, C.; PREVOST, G.; ANDREMONT, A. 1993. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol**. 4:982-985.

SAVELKOUL, P.H.; AARTS, H.J.; DE HAAS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J.L.; SCHOOLS, L.; LENSTRA, J.A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **J. Clin. Microbiol**. 10:3083-3091.

SAWADA, M.; OSAWA, S.; KOBAYASHI, H.; HORI, H.; MUTO, A. 1981. The number of ribosomal RNA genes in *Mycoplasma capricolum*. **Mol. Gen. Genet**. 182:502-504.

SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**. 37:67-75.

SHAVER, Y.J.; NAGPAL, M.L.; RUDNER, R.; NAKAMURA, L.K.; FOX, K.F.; FOX, A. 2002. Restriction fragment length polymorphism of rRNA operons for discrimination and intergenic spacer sequences for cataloging of *Bacillus subtilis* sub-groups. **J. Microbiol. Methods**. 50: 215-223.

SHIFFMAN, D. & COHEN, S.N. 1992. Reconstruction of a *Streptomyces* linear replicon from separately cloned DNA fragments: existence of a critic origin of circular replication within the linear plasmid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 89:6129-6133.

SILVA, D. & WITTEWER, C.T. 2000. Monitoring hybridization during polymerase chain reaction. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.** 1:3-13.

SILVA, E.P. & RUSSO, C.A.M. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. **Hydrobiologia**. 420:119-135.

SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. 1988. *Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS. pp 235.

SMITH, C. L.; KLCO, S. R.; CANTOR, C. R. 1988. Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. *In* DAVIES, K. E. (ed). **Genome analysis: A practical approach**. Oxford: IRL Press, Chapter 3.

SMITH, J.M.; DOWSON, C.G.; SPRATT, B.G. 1991. Localized sex in bacteria. **Nature**. 349:29-31.

SOARES-RAMOS, J.R.L.; Ramos, H.J.O.; Cruz, L.M.; Chubatsu, L.S.; Pedrosa, F.O.; Rigo, L.U.; Souza, E.M. 2003. Comparative Molecular Analysis of *Herbaspirillum* Strains by RAPD, RFLP and 16S rDNA Sequencing. Em publicação. **Genetics and Molecular Biology**.

SOKAL, R.R. & MICHENER, C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Univ. Kans. Sci. Bull.** 38:1409-1438.

SPEERT, D.P. 2002. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. **Front. Biosci.** 7:354-361

STALEY, J.T. Bacterial biodiversity: a time for place. 1999. **ASM News**. 65:681-687.

SUWANTO, A.; KAPLAN, S. 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2,4,1 genome: Presence of two unique circular chromosomes. **J. Bacteriol.** 171:5850-5859.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673-4680.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 56:105-114.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. 1996. **Microbiol. Rev.** 60:407-438.

VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HOLMES, B.; COENYE, T.; HOSTE, B.; DE VOS, P.; HENRY, D.; SPEERT, D.P. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. Nov. (formerly *Burkholderia cepacia* Genomovar IV). **J. Clin. Microbiol.** 38:1042-1047.

VANEECHOUTTE, M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. **Mol. Biotechnol.** 6:115-142.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **J. Biotechnol.** 91:127-141.

WANG, D., WAYNE, M.M.Y., TARICANI, M., BUCKINGAM, K., SNDHAM, H.J. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. **BioTechniques** 14:214-218.

WEBER, O.B. 1998. Ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em bananeiras (*Musa* spp) e abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L.) MERRIL) e seus efeitos no crescimento de mudas micropopagadas. Rio de Janeiro, 192p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18:7213-7218.

WEISBURG, W.; BARNS, S.; PELLETIER, D.; LANE, D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.** 173:697-703.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18:6531-6535.

WILSON, A.C.; CARLSON, S.S.; WHITE, T.J. 1977. Biochemical evolution. **Annu. Rev. Biochem.** 46: 573-639.

WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.** 51:221-271.  
WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archae, Bacteria and Eucarya. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87:4576-4579.

WREN, B.W. 2000. Microbiol genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. **Nature Rev. Genet.** 1:30-39.

XIA, Y.; EMBLEY, T.M.; O'DONNELL, A.G. 1994. Phylogenetic analysis of *Azospirillum* by direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA. **System. Appl. Microbiol.** 17:197-201.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strains BTail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J. Bacteriol.** 173: 2271-2277.

YOUNG, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *In*: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall. p.43-86.

ZHANG, G.W.; KOTIW, M.; DAGGARD, G. 2002. A RAPD-PCR genotyping assay which correlates with serotypes of group *B. streptococci*. **Lett. Appl. Microbiol.** 3:247-250.

ZUERNER, R. L.; HERRMANN, J. L.; SAINT GIRONS, I. 1993. Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. **J. Bacteriol.** 175:5445-5451.

**Apêndice 1** - Alinhamento entre as seqüências parciais do gene 16S rRNA de organismos pertencentes subdivisão  $\beta$  das proteobactérias obtidas no Banco de dados GenBank e as obtidas neste estudo (\*). O alinhamento foi feito no programa BioEdit.

	10	20	30	40	50
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. frisingense</i>	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>P. huttiensis</i>	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>P. huttiensis</i>	ANCCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _Z67	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. frisingense</i> _Mb11	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. frisingense</i> _GSF30	-TGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. frisingense</i> _75B	-TGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	-TGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	ATGCCTT-CAC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CGC--GGCGG	GTAACCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _X8	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _BA153	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. rubrisubalbicans</i>	----CTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CGC--GGGGG	GTAACCTCCT-
<i>H. seropedicae</i>	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>E. coli</i> _K12	AGGCCTA-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGTAA	CAGGAAGAAG	CTTGCTTCTT
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	ATGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	ATGCCTT-AC	ACAATGCAAT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	-TGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	-TGCCTT-AC	ACATGCAAGT	CGAACGGCAG	CAT--AGGAG	CTTGCTCCT-
	60	70	80	90	100
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>H. frisingense</i>	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>P. huttiensis</i>	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>P. huttiensis</i>	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>H. seropedicae</i> _Z67	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>H. frisingense</i> _Mb11	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>H. frisingense</i> _GSF30	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>H. frisingense</i> _75B	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT-AAT	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA

<b>Herbaspirillum</b> sp BA17	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp NAH4	-GWCGGCGAG	TGCCGAACGG	GTGACW <del>TRAT</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCAAGA
<b>H. seropedicae</b> _X8	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp BA10	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp BA11	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp BA12	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp BA14	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp BA15	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. seropedicae</b> _BA153	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA16	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA161	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. rubrisubalbicans</b>	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>P. huttiensis</b> _ATCC146	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>Herbaspirillum</b> sp_G8A1	-GWCGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCAAGA
<b>H. seropedicae</b>	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>E. coli</b> _K12	TGCTGACGAG	TGGCGGACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	GTCTGGGAAA	CTGCCCTGATG
<b>H. seropedicae</b> _ZA69 (*)	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. seropedicae</b> _Z152 (*)	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. seropedicae</b> _Z67 (*)	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. seropedicae</b> _ZA95 (*)	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. seropedicae</b> _Z78 (*)	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. rubrisubalbicans</b> _M4 (*)	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA
<b>H. seropedicae</b> _M2 (*)	-GATGGCGAG	TGGCGAACGG	GTGAGT- <del>AA</del>	ATATCGGAAC	GTGCCCTAGA

	110	120	130	140	150
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>H. frisingense</b>	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>P. huttiensis</b>	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_B501	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_B512	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_B65	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>P. huttiensis</b>	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b> _Z67	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. frisingense</b> _Mb11	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>H. frisingense</b> _GSF30	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. frisingense</b> _75B	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. rubrisubalbicans</b> _M4	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA17	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_NAH4	GTGGGG-ATA	ACTAGTCGAA	AGATTGGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b> _X8	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA10	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA11	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA12	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA14	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA15	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b> _BA153	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA16	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_BA161	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. rubrisubalbicans</b>	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>P. huttiensis</b> _ATCC146	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>Herbaspirillum</b> sp_G8A1	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTGGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b>	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>E. coli</b> _K12	GAGGGGGATA	ACTACTGGAA	ACGGTAGCTA	ATACCGCATA	ACGTGCAAG
<b>H. seropedicae</b> _ZA69 (*)	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b> _Z152 (*)	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b> _Z67 (*)	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b> _ZA95 (*)	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. seropedicae</b> _Z78 (*)	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
<b>H. rubrisubalbicans</b> _M4 (*)	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGACTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTAAGG
<b>H. seropedicae</b> _M2 (*)	GTGGGGGATA	ACTAGTCGAA	AGAATTAGCTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG

	160	170	180	190	200
<i>H. rubrisubalbicans</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. frisingense</i>	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>P. huttiensis</i>	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>P. huttiensis</i>	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _Z67	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. frisingense</i> _Mb11	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. frisingense</i> _GSF30	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. frisingense</i> _75B	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _X8	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _BA153	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. rubrisubalbicans</i>	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i>	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>E. coli</i> _K12	ACCAAAGAGG	GGGACCTTCG	GGCCTCTTGC	CATCGGATGT	GCCCAGATGG
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GAACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	ATGAAAGTGG	GGGATCGCAA	GACCTCATGC	TCCTGGAGCG	GCCGATATCT

	210	220	230	240	250
<i>H. rubrisubalbicans</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. frisingense</i>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>P. huttiensis</i>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>P. huttiensis</i>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCAAC	GATCAGTAGC
<i>H. seropedicae</i> _Z67	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>H. frisingense</i> _Mb11	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCAAC	GATCAGTAGC
<i>H. frisingense</i> _GSF30	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCTCA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>H. frisingense</i> _75B	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCTCA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>H. seropedicae</i> _X8	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCTCA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC

<b>H. seropedicae_BA153</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>Herbaspirillum_sp_BA16</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>Herbaspirillum_sp_BA161</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>H. rubrisubalbicans</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>Herbaspirillum_sp_G8A1</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>H. seropedicae</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>E. coli_K12</b>	-GATTAGCTA	GTAGGTGGGG	TAAACGGCTCA	CCTAGGCGAC	GATCCCTAGC
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	TGATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGT
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	-GATTAGCTA	GTTGGTGGGG	TAAAAGCCTA	CCAAGGCGAC	GATCAGTAGC

	260	270	280	290	300
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. frisingense</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>P. huttiensis</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GGGCCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_B501</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_B512</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_B65</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>P. huttiensis</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae_Z67</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. frisingense_Mb11</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. frisingense_GSF30</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. frisingense_75B</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA17</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_NAH4</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae_X8</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA10</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA11</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA12</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA14</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA15</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae_BA153</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA16</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_BA161</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. rubrisubalbicans</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>Herbaspirillum_sp_G8A1</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>E. coli_K12</b>	TGGTCTGAGA	GGATGACCAG	CCACACTGGA	ACTGAGACAC	GG-TCCAGAC
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CC-AGAC
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ATTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	TGGTCTGAGA	GGACGACCAG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GG-CCCAGAC

	310	320	330	340	350
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. frisingense</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>P. huttiensis</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum_sp_B501</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum_sp_B512</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA

<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>P. huttiensis</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. seropedicae_Z67</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. frisingense_Mb11</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. frisingense_GSF30</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. frisingense_75B</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTT	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACC--GA
<b>H. seropedicae_X8</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. seropedicae_BA153</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. rubrisubalbicans</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. seropedicae</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>E. coli_K12</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	CACAATGGGC	GCAAGCCTGA
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	-CAACCCTGA
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCCACCCTGA
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA

	360	370	380	390	400
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. frisingense</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>P. huttiensis</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_B501</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_B512</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>P. huttiensis</b>	TCC-ACAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. seropedicae_Z67</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. frisingense_Mb11</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. frisingense_GSF30</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. frisingense_75B</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGTGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCACTTT
<b>H. seropedicae_X8</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. seropedicae_BA153</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>H. rubrisubalbicans</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGTGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCACTTT
<b>H. seropedicae</b>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<b>E. coli_K12</b>	TGCAGCCATG	CCGCGTGTAT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGTACTTT

<i>H. seropedicae_ZA69 (*)</i>	TC--ACAATG	ACGCGTGAGT	GAAAAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<i>H. seropedicae_Z152 (*)</i>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<i>H. seropedicae_Z67 (*)</i>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<i>H. seropedicae_ZA95 (*)</i>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<i>H. seropedicae_Z78 (*)</i>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<i>H. rubrisubalbicans_M4 (*)</i>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT
<i>H. seropedicae_M2 (*)</i>	TCCAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT

	410	420	430	440	450
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>H. frisingense</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTC	TGGATAAT-A	CCTAGAGCTA	ATGACG--GT
<i>P. huttiensis</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTAG	TAGCTAAT-A	TCTATTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_B501</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTC	TGGCTAAT-A	TCCAGAGCTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_B512</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTC	TGGCTAAT-A	TCCAGAGCTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_B65</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTAG	TAGCTAAT-A	TCTATTACTA	ATGACG--GT
<i>P. huttiensis</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTAG	TAGCGAATAA	-CTATTACTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae_Z67</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	TGGCTAAT-A	TCCAGAACTA	ATGACG--GT
<i>H. frisingense_Mb11</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTC	TGGATAAT-A	CCTAGGACTA	ATGACG--GT
<i>H. frisingense_GSF30</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTC	TGGATAAT-A	CCTGGAGCTA	ATGACG--GT
<i>H. frisingense_75B</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTC	TGGATAAT-A	CCTGGGACTA	ATGACG--GT
<i>H. rubrisubalbicans_M4</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA17</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_NAH4</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGA	CGGCTAAT-A	TCCCTTGCTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae_X8</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTC	TGGATAAT-A	CCTGGGACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA10</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA11</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA12</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTGCTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA14</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA15</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae_BA153</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	TGGCTAAT-A	TCCAGAACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA16</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_BA161</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTGCTA	ATGACG--GT
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TGTCAGGGAA	GAAACCGGTG	GAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>P. huttiensis_ATCC146</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTAG	TAGCGAAT-A	ACTATTACTA	ATGACG--GT
<i>Herbaspirillum sp_G8A1</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGA	GGGCTAAT-A	TCCCTTGCTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	TGGCTAAT-A	TCCAGAACTA	ATGACG--GT
<i>E. coli_K12</i>	CAGCGGGGAG	GAAAGGGAGTA	AAGTTAAT-A	CCTTTGCTCA	TTGACG--TT
<i>H. seropedicae_ZA69 (*)</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	CGGCTAATTA	TCCAGAACTA	ATGACGTCGT
<i>H. seropedicae_Z152 (*)</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	TGGCTAAT-A	TCCAGAACTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae_Z67 (*)</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	TGGCTAAT-A	TCCAGAACTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae_ZA95 (*)</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	TGGCTTAT-A	TCCAGAACTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae_Z78 (*)</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTTT	TGGCTAAT-A	TCCAGAACTA	ATGACG--GT
<i>H. rubrisubalbicans_M4 (*)</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGG	TAGCTAAT-A	TCTACTACTA	ATGACG--GT
<i>H. seropedicae_M2 (*)</i>	TGTCAGGGAA	GAAACGGTGT	TGGCTAAT-A	TCCACAACTA	ATGACG--GT

	460	470	480	490	500
	... ....	... ....	... ....	... ....	... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>H. frisingense</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>P. huttiensis</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>Herbaspirillum sp_B501</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>Herbaspirillum sp_B512</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>Herbaspirillum sp_B65</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>P. huttiensis</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAGCC	CGCGGTAATA
<i>H. seropedicae_Z67</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>H. frisingense_Mb11</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>H. frisingense_GSF30</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>H. frisingense_75B</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>H. rubrisubalbicans_M4</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<i>Herbaspirillum sp_BA17</i>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA

<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_X8</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_BA153</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. rubrisubalbicans</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>E. coli_K12</b>	ACCCGCAGAA	GAAGCACCGG	CTAACTCCGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCCAGC	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTAATA
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	ACCTGAAGAA	TAAGCACCGG	CTAACTACGT	GCCAGCAG-C	CGCGGTACTA

	510	520	530	540	550
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	--GCGTGCGCA
<b>H. frisingense</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>P. huttiensis</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_B501</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_B512</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>P. huttiensis</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. seropedicae_Z67</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. frisingense_Mb11</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. frisingense_GSF30</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. frisingense_75B</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGCCGTAAA	AGCGTGCGCA
<b>H. seropedicae_X8</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. seropedicae_BA153</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. rubrisubalbicans</b>	CGTAGGGTGC	AACCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-ACGTGCGCA
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. seropedicae</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>E. coli_K12</b>	CGGAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGCACGCA
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGTAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCCCA
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	CGTAGGGTGC	AACGCTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTTAA	-GCGTGCGCA
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	CGTAGGGTGC	AACGCTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	CGTAGGGTGC	AACGCTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	CGTAGGGTGC	AACGCTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	CGTAGGGTGC	AAGCGTTAAT	CGGAATTACT	GGGC-GTAAA	-GCGTGCGCA

	560	570	580	590	600
<i>H. rubrisubalbicans</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. frisingense</i>	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>P. huttiensis</i>	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>P. huttiensis</i>	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i> _Z67	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. frisingense</i> _Mb11	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. frisingense</i> _GSF30	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. frisingense</i> _75B	GGCGGTTG-T	GTAAGTCATA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i> _X8	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i> _BA153	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAANCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i>	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>E. coli</i> _K12	GGCGGTTT-G	TTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAACT
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	GGCGGTTGAT	GTAGAACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCA-	CCTGGGA-TT
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	GGCGGTTG-T	GTAAGACAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	GGCGGTTG-T	GTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CCGGGCTCAA	CCTGGGAATT
	610	620	630	640	650
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. frisingense</i>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>P. huttiensis</i>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>P. huttiensis</i>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGANGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. seropedicae</i> _Z67	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. frisingense</i> _Mb11	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. frisingense</i> _GSF30	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. frisingense</i> _75B	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AG--GTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. seropedicae</i> _X8	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	GCATTTGTGA	CTGCACGCTA	G-AGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC
<i>H. seropedicae</i> _BA153	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCCAC

<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. rubrisubalbicans</b>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>P. huttiensis ATCC146</b>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. seropedicae</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>E. coli K12</b>	GCATCTGATA	CTGGCAAGCT	TGAGTCTCGT	AGAGGGGGGT	AGAATTCAG
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	A-AATGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	GCATTTGAGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	GCATTTGTGA	CTGCACGGCT	AGAGTGTGTC	AGAGGGGGGT	AGAATTCAC

	660	670	680	690	700
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. frisingense</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>P. huttiensis</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_B501</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_B512</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>P. huttiensis</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_Z67</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. frisingense_Mb11</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. frisingense_GSF30</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. frisingense_75B</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GAGATGTGGA	GGATTACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_X8</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_BA153</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. rubrisubalbicans</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>P. huttiensis ATCC146</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GAGATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>E. coli K12</b>	GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GAGATCTGGA	GGAATACCGG	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGACAGG
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GGAATACCGA	TGGCGA-AGG

	710	720	730	740	750
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. frisingense</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>P. huttiensis</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_B501</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA

<b>Herbaspirillum sp_B512</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>P. huttiensis</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae_Z67</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. frisingense_Mb11</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. frisingense_GSF30</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. frisingense_75B</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae_X8</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae_BA153</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. rubrisubalbicans</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>E. coli_K12</b>	CGGCCCCCTG	GACGAAGACT	GACGCTCAGG	TGCGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAG
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA
<b>H_seropedicae_M2(*)</b>	CAGCCCCCTG	GGATAACACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA

	760	770	780	790	800
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. frisingense</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>P. huttiensis</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_B501</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_B512</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>P. huttiensis</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. seropedicae_Z67</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. frisingense_Mb11</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. frisingense_GSF30</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H_frisingense_75B</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. seropedicae_X8</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. seropedicae_BA153</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. rubrisubalbicans</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<b>H. seropedicae</b>	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT

<i>E. coli</i> _K12	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAACCGATG	TCGACTTGGA
<i>H. seropedicae</i> _ZA69 (*)	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<i>H. seropedicae</i> _Z152 (*)	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<i>H. seropedicae</i> _Z67 (*)	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAA-CGATG	TCTACT-AGT
<i>H. seropedicae</i> _ZA95 (*)	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<i>H. seropedicae</i> _Z78 (*)	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4 (*)	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT
<i>H. seropedicae</i> _M2 (*)	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGATG	TCTACT-AGT

	810	820	830	840	850
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. frisingense</i>	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>P. huttiensis</i>	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_B501	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_B512	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_B65	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>P. huttiensis</i>	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _Z67	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. frisingense</i> _Mb11	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. frisingense</i> _GSF30	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. frisingense</i> _75B	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA17	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_NAH4	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _X8	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA10	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA11	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA12	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA14	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA15	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _BA153	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA16	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_BA161	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>Herbaspirillum</i> _sp_G8A1	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i>	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>E. coli</i> _K12	GGTTGTGCC	TTGAG-GCGT	GGCTTCCGGA	GCTAACGCGT	TAAGTCGACC
<i>H. seropedicae</i> _ZA69 (*)	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _Z152 (*)	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _Z67 (*)	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _ZA95 (*)	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _Z78 (*)	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4 (*)	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC
<i>H. seropedicae</i> _M2 (*)	TGTCGGGTCT	TAATT-GACT	TGGTAACGCA	GCTAACGCGT	GAAGTAGACC

	860	870	880	890	900
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>H. frisingense</i>	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>P. huttiensis</i>	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> _sp_B501	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> _sp_B512	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> _sp_B65	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>P. huttiensis</i>	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _Z67	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>H. frisingense</i> _Mb11	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>H. frisingense</i> _GSF30	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>H. frisingense</i> _75B	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGGA

<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _X8	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _BA153	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i>	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>E. coli</i> _K12	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	GCCTGGGGAG	TACG-TCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	GCCTGGGGAG	TACGGTCG-C	AAGATTTAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA

	910	920	930	940	950
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. frisingense</i>	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>P. huttiensis</i>	CCCTGCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>P. huttiensis</i>	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i> _Z67	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. frisingense</i> _Mb11	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. frisingense</i> _GSF30	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. frisingense</i> _75B	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i> _X8	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i> _BA153	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. rubrisubalbicans</i>	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i>	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>E. coli</i> _K12	CCC-GCACAA	GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAGAA
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	CCGCGAAAAC
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	CCC-GCACAA	GCGGTGGATG	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA	ACGCGAAAAA

	960	970	980	990	1000
<i>H. rubrisubalbicans</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. frisingense</i>	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>P. huttiensis</i>	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TAGGAGTGCT
<i>P. huttiensis</i>	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _Z67	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. frisingense</i> _Mb11	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. frisingense</i> _GSF30	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. frisingense</i> _75B	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGCTGAGAGG	CGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _X8	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _BA153	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. rubrisubalbicans</i>	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GATGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGCTGAGAGG	CGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i>	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>E. coli</i> _K12	CCTTACCTGG	TCTTGACATC	CACGGAAAGTT	TTCAGAGA--	TGAGAATGTG
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	CGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	CCTTACCTAC	CCTTGACATG	GTCGGAATCC	TGAAGAGATT	TGGGAGTGCT
	1010	1020	1030	1040	1050
<i>H. rubrisubalbicans</i>	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. frisingense</i>	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>P. huttiensis</i>	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCG-C	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>P. huttiensis</i>	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i> _Z67	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. frisingense</i> _Mb11	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. frisingense</i> _GSF30	CGAAAGAGAG	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. frisingense</i> _75B	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGAC	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i> _X8	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC

<i>H. seropedicae</i> _BA153	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. rubrisubalbicans</i>	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	CGAAAGAGAA	CCATCACACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i>	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>E. coli</i> _K12	CCTTCGGGAA	CCGTGAGACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTT
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGCG	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	CGAAAGAGAA	CCGGCGCACA	GGTGCTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC

	1060	1070	1080	1090	1100
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. frisingense</i>	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>P. huttiensis</i>	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>P. huttiensis</i>	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. seropedicae</i> _Z67	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. frisingense</i> _Mb11	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. frisingense</i> _GSF30	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. frisingense</i> _75B	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTTATTAGT
<i>H. seropedicae</i> _X8	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. seropedicae</i> _BA153	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. seropedicae</i>	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>E. coli</i> _K12	GTGAAATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TATCCTTTGT
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CACAA-CCCT	TGTCATAAGT
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT
<i>H. seropedicae</i> _M2(*)	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAA-CCCT	TGTCATTAGT

	1110	1120	1130	1140	1150
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<i>H. frisingense</i>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<i>P. huttiensis</i>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--

<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>P. huttiensis</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_Z67</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. frisingense_Mb11</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. frisingense_GSF30</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. frisingense_75B</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	TGCTA-CATT	C-AGTTGAGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_X8</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_BA153</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. rubrisubalbicans</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	TGCTA-CATT	C-AGTTGAGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>E. coli_K12</b>	TGCCAGCGGT	CCGGCCGGGA	ACTCAAGGGA	GACTGCCAGT	GATAAACT--
<b>H. seropedicae_ZA69(*)</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_Z152(*)</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_Z67(*)</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GAATGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_ZA95(*)</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_Z78(*)</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. rubrisubalbicans_M4(*)</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GACTGCCGGT	GACAAACC--
<b>H. seropedicae_M2(*)</b>	TGCTA-CGA-	----AAGGGC	ACTCTAATGA	GAGTGCCGGT	GACAAACC--

	1160	1170	1180	1190	1200
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<b>H. rubrisubalbicans</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. frisingense</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>P. huttiensis</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_B501</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_B512</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_B65</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>P. huttiensis</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. seropedicae_Z67</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. frisingense_Mb11</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. frisingense_GSF30</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. frisingense_75B</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. rubrisubalbicans_M4</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA17</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_NAH4</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. seropedicae_X8</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA10</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA11</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA12</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA14</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA15</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. seropedicae_BA153</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA16</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_BA161</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. rubrisubalbicans</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>P. huttiensis_ATCC146</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>Herbaspirillum sp_G8A1</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>H. seropedicae</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<b>E. coli_K12</b>	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCATC	ATGGCCCTTA	CGAC--CAGG

<i>H. seropedicae_ZA69</i> (*)	GGAGGAAGGT	GGGCATGACA	TCAATTCCTC	ATGGCCGTTA	TGG---TAGG
<i>H. seropedicae_Z152</i> (*)	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<i>H. seropedicae_Z67</i> (*)	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<i>H. seropedicae_ZA95</i> (*)	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<i>H. seropedicae_Z78</i> (*)	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<i>H. rubrisubalbicans_M4</i> (*)	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG
<i>H. seropedicae_M2</i> (*)	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC	ATGGCCCTTA	TGGG--TAGG

	1210	1220	1230	1240	1250
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. frisingense</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>P. huttiensis</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>P. huttiensis</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_Z67</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. frisingense_Mb11</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. frisingense_GSF30</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. frisingense_75B</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. rubrisubalbicans_M4</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_X8</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_BA153</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>P. huttiensis_ATCC146</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae</i>	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>E. coli_K12</i>	GCTACACACG	TGCTACAATG	GCGCATACAA	AGAGAAGCGA	CCTCGCGAGA
<i>H. seropedicae_ZA69</i> (*)	GCATCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_Z152</i> (*)	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_Z67</i> (*)	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_95</i> (*)	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_Z78</i> (*)	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. rubrisubalbicans_M4</i> (*)	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG
<i>H. seropedicae_M2</i> (*)	GCTTCACACG	TCATACAATG	GTACATACAG	AGGGCCGCCA	ACCCGCGAGG

	1260	1270	1280	1290	1300
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT
<i>H. frisingense</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>P. huttiensis</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT
<i>P. huttiensis</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae_Z67</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. frisingense_Mb11</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. frisingense_GSF30</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. frisingense_75B</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. rubrisubalbicans_M4</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT

<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i> _X8	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i> _BA153	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i>	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>E. coli</i> _K12	GCAAGCGGAC	CTCATAAAGT	GCGTCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGGA	GTCTGCAACT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT
<i>H_seropedicae</i> _M2(*)	GGGAGCTAAT	CCCAGAAAGT	GTATCGTAGT	CCGGATTGTA	GTCTGCAACT

	1310	1320	1330	1340	1350
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. frisingense</i>	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>P. huttiensis</i>	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>P. huttiensis</i>	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i> _Z67	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. frisingense</i> _Mb11	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. frisingense</i> _GSF30	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. frisingense</i> _75B	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i> _X8	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i> _BA153	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. rubrisubalbicans</i>	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i>	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>E. coli</i> _K12	CGACTCCATG	AAGTCGGAAT	CGCTAGTAAT	CGTGGATCAG	AATGCCACGG
<i>H. seropedicae</i> _ZA69(*)	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i> _Z152(*)	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i> _Z67(*)	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i> _ZA95(*)	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. seropedicae</i> _Z78(*)	CGACTCCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4(*)	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG

<i>H. seropedicae</i> _M2 (*)	CGACTACATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGTCGCGG
	1360	1370	1380	1390	1400
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. frisingense</i>	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>P. huttiensis</i>	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>P. huttiensis</i>	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _Z67	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. frisingense</i> _Mb11	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. frisingense</i> _GSF30	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. frisingense</i> _75B	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _X8	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _BA153	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i>	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>E. coli</i> _K12	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGTG
<i>H. seropedicae</i> _ZA69 (*)	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _Z152 (*)	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _Z67 (*)	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _ZA95 (*)	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _Z78 (*)	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _M4 (*)	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
<i>H. seropedicae</i> _M2 (*)	TGAATACGTT	CCCAGGTCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CATGGGAGCG
	1410	1420	1430	1440	1450
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. frisingense</i>	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>P. huttiensis</i>	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>P. huttiensis</i>	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _Z67	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. frisingense</i> _Mb11	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. frisingense</i> _GSF30	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. frisingense</i> _75B	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	GGGTTTACCA	GAGGTAGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGGG	CATACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _X8	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG

<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _BA153	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. rubrisubalbicans</i>	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGGG	CTCACCACGG
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	GGTTTCACCA	GAAGTAGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTTACCACGG
<i>H. seropedicae</i>	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>E. coli</i> _K12	GGTTGCAAAA	GAAGTAGGTA	GCTTAACCTT		CGGGAGGGCG	CTTACCACCT
<i>H. seropedicae</i> _ZA69 (*)	GGTTTTACCA	GAAGTGGTAG	CACTAACC	GC	TAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _Z152 (*)	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _Z67 (*)	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _ZA95 (*)	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _Z78 (*)	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4 (*)	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG
<i>H. seropedicae</i> _M2 (*)	GGTTTTACCA	GAAGTGGGTA	GCCTAACC	GC	AAGGAGGGCG	CTCACCACGG

1460

	.... ....
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TAGGATTCGT
<i>H. frisingense</i>	TAG-----
<i>P. huttiensis</i>	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B501	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B512	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_B65	TAGGATTCGT
<i>P. huttiensis</i>	TAGAGTTTG-
<i>H. seropedicae</i> _Z67	TAGGATTCGT
<i>H. frisingense</i> _Mb11	TAGGATTCGT
<i>H. frisingense</i> _GSF30	TAGGATTCGT
<i>H. frisingense</i> _75B	TAGGATTCGT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA17	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_NAH4	TTGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i> _X8	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA10	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA11	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA12	TACGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA14	TAGCATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA15	TAGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i> _BA153	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA16	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_BA161	TAAGATTCGT
<i>H. rubrisubalbicans</i>	TAGGATTCGT
<i>P. huttiensis</i> _ATCC146	TAGGATTCGT
<i>Herbaspirillum</i> sp_G8A1	TGGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i>	TAGGATTCGT
<i>E. coli</i> _K12	TGTGATTCAT
<i>H. seropedicae</i> _ZA69 (*)	TAGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i> _Z152 (*)	TAGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i> _Z67 (*)	TAGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i> _ZA95 (*)	TAGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i> _Z78 (*)	TAGGATTCGT
<i>H. rubrisubalbicans</i> _M4 (*)	TAGGATTCGT
<i>H. seropedicae</i> _M2 (*)	TAGGATTCGT