



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDREY BARBOSA CORDEIRO

**ESTUDO TAXÔNOMICO E FILOGENÉTICO DE ESTIRPES
DE RIZÓBIOS SIMBIONTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus
vulgaris* L.) PROVENIENTES DO MÉXICO**

ANDREY BARBOSA CORDEIRO

**ESTUDO TAXÔNOMICO E FILOGENÉTICO DE ESTIRPES
DE RIZÓBIOS SIMBIONTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus
vulgaris* L.) PROVENIENTES DO MÉXICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cordeiro, Andrey Barbosa.

Estudo taxônomico e filogenético de estirpes de rizóbios simbiossantes do feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.) provenientes do México / Andrey Barbosa Cordeiro. - Londrina, 2018.
69 f.:il.

Orientador: Mariangela Hungria.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 2018. Inclui bibliografia.

1. Fixação Biológica do Nitrogênio, Filogenia de Procariotos, Taxonomia, Rhizobium - Tese. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. III. Título.

ANDREY BARBOSA CORDEIRO

**ESTUDO TAXÔNOMICO E FILOGENÉTICO DE ESTIRPES DE
RIZÓBIOS SIMBIONTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)
PROVENIENTES DO MÉXICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Soja

Dr. Renan Augusto Ribeiro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Soja

Dra. Jakeline Renata Marçon Delamuta
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Soja

Londrina, 27 de Outubro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Obrigado a minha família e amigos. Imensamente grato por estarem ao meu lado, pelos conselhos e apoio durante estes anos, pela força, incentivo e animo para seguir em busca dessa conquista, sendo fortes junto comigo, mostrando o lado bom da vida e os benefícios de estar rodeado de pessoas espetaculares. Vocês foram essenciais!

Obrigado a todos do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja pela ajuda, apoio, força, carinho e incentivo. Pelas horas de trabalho, interpretação de dados e também, pelas risadas e conversas durante as horas do café, obrigado à Dona Rosa, Josi, Artur, Walkyria, Paula, Brenda, Carol, Biana, Francine, Rinaldo, Marcos, Dr. Marco Antonio, Maira, Leandro, Jesi, Anna Karolina, Jackson, Renata, Eduara, Bettina, Pablo, Júlia, Letícia, João e Vivian. Gratidão especial à Rebeca, Lully, Mariana, Renan, Jakeline, Dáfila, Ligia e chefe.

Aos amigos e companheiros de sala de aula durante as disciplinas do mestrado, obrigado pela amizade construída entre nós, pelo apoio e energia que colocamos para ajudar uns aos outros, pelo animo a cada apresentação ou lista de exercícios de bioestatística, pelas gargalhadas e choros compartilhados, pelo congresso.

À chefe, Dra. Mariangela, muito obrigado. Você é um grande exemplo de índole, de força emocional e intelectual. Obrigado por compartilhar histórias e conteúdos científicos com tanto carinho e amor. Pela enorme paciência e perspectiva de que as coisas podem dar certo.

CORDEIRO, Andrey Barbosa. **Estudo taxonômico e filogenético de estirpes de rizóbios simbiotes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do México**. 2018. 69f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Bactérias diazotróficas conhecidas como rizóbios são importantes por realizarem a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com leguminosas, sendo, em alguns casos, utilizadas como inoculantes microbianos, substituindo o uso de fertilizantes nitrogenados. A identificação e a classificação dos microrganismos capazes de realizar a FBN fornecem conhecimento sobre a evolução e a relação entre as espécies, permitindo estudar aquelas de maior interesse biotecnológico. Em relação à planta hospedeira, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é a principal leguminosa utilizada na alimentação humana na América do Sul, América Central, África e em alguns países da Ásia. O objetivo deste trabalho foi determinar o grupo taxonômico e as relações filogenéticas de três estirpes de rizóbios (CNPSo 661, 666 e 668), isoladas do centro principal de origem/diversidade genética da leguminosa hospedeira, o México, por meio de um estudo polifásico. Em estudos prévios, essas três estirpes foram identificadas como pertencendo a uma nova linhagem (PEL-3). As sequências do gene 16S rRNA posicionaram as três estirpes em um grande grupo, incluindo *R. etli*. A análise de sequências multilocus (*multilocus sequencing analysis*, MLSA) de quatro genes conservados (*recA*, *glnII*, *gyrB* e *rpoA*) posicionou as três estirpes em um grupo distinto de todas as outras espécies descritas, com 100 % de suporte *bootstrap* e a identidade de nucleotídeos (*nucleotide identity*, NI) dos quatro genes concatenados com a espécie mais próxima, *R. etli*, foi de 95,0 %. Os valores médios de identidade de nucleotídeos do genoma total (*average nucleotide identity*, ANI) da estirpe CNPSo 668 com a espécie mais próxima, *R. etli*, foi de 92,9 %. Nas análises do gene de fixação do nitrogênio *nifH* e do gene de nodulação *nodC*, as estirpes foram agrupadas com outros simbiotes do feijoeiro. Outros aspectos fenotípicos e genotípicos foram determinados para o novo grupo e os dados suportaram a descrição das três estirpes CNPSo como uma nova espécie, para a qual o nome *Rhizobium esperanzae* foi proposto e aceito. A estirpe tipo representativa da nova espécie é a CNPSo 668^T (= UMR 1320^T = Z87-8^T = LMG 30030^T = U 10001^T).

Palavras-chave: Fixação biológica do nitrogênio. Filogenia de procariotos. Taxonomia de procariotos. *Rhizobium*. *Rhizobium esperanzae*

CORDEIRO, Andrey Barbosa. **Taxonomic and phylogenetic study of rhizobium strains symbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Mexico**. 2018. 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Diazotrophic bacteria known as rhizobia are important due to their capacity of establishing the biological nitrogen fixation (BNF) process when in symbiosis with legumes; in some cases, the bacteria are used as microbial inoculants, replacing the use of nitrogen fertilizers. The identification and the classification of microorganisms capable of performing BNF are important to generate knowledge about their evolution and the relationships between species, allowing the study of those of greater biotechnological interest. In relation to the host plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the main legume used for human consumption in South America, Central America, Africa and some Asian countries. The objective of this study was to determine the taxonomic group and the phylogenetic relationships of three strains (CNPSO 661, 666 e 668) isolated from the main center of genetic origin/diversity of the legume host, Mexico, by means of a polyphasic study. In previous studies these three strains were identified as belonging to a new rhizobial lineage (PEL3). Sequences of the 16S rRNA gene positioned the three strains in a large clade including *R. etli*. Multilocus sequence analysis (MLSA) with four housekeeping genes (*recA*, *glnII*, *gyrB* and *rpoA*) positioned the three strains in a clade distinct from all other described species, with 100 % bootstrap support, and nucleotide identity (NI) of the four concatenated genes with the closest species *R. etli* was 95.0 %. Average nucleotide-identity (ANI) values of the whole genome of CNPSO 668^T and the closest species, *R. etli*, was 92.9 %. In the analyses of the nitrogen-fixation gene *nifH* and of the nodulation gene *nodC*, the strains composed a cluster with other rhizobial symbionts of common bean. Other phenotypic and genotypic traits were determined for the new group and the data supported the description of the three CNPSO strains as a novel species, for which the name *Rhizobium esperanzae* was proposed and accepted. The type strain for the new species is CNPSO 668^T (=UMR 1320^T =Z87-8^T =LMG 30030^T =U 10001^T).

Key-words: Biological nitrogen fixation. Phylogeny of prokaryotes. Taxonomy of prokaryotes. *Rhizobium*. *Rhizobium esperanzae*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GERAL	9
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1	FEIJOEIRO COMUM.....	10
3.2	NITROGÊNIO E O PROCESSO DE FBN	11
3.3	TÉCNICAS MOLECULARES PARA CLASSIFICAÇÃO DE NOVA ESPÉCIE BACTERIANA	13
3.4	GENES NOD E NIF	17
3.5	TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS	18
3.7	REFERÊNCIAS	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	ARTIGO	36
	CONCLUSÃO	69

1 INTRODUÇÃO

As leguminosas possuem grande importância na sociedade devido a sua contribuição para a dieta alimentar de milhares de pessoas e animais, por serem ricas em proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras e vitaminas do grupo B. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa cultivada de grande relevância mundial, presente na alimentação de mais de 200 milhões de pessoas nos trópicos, inclusive fazendo parte da alimentação diária dos brasileiros (BARBOSA, 2007; CGIAR, 2016).

Essa leguminosa apresenta boa adaptação a diversas características edafoclimáticas, tornando possível seu cultivo em diferentes tipos de solo e clima. Para a produção de seus grãos, são necessárias altas quantidades de nitrogênio (N), nutriente responsável pela formação das moléculas de proteína, hormônios e ácidos nucleicos. Entretanto, o N presente no solo muitas vezes não está disponibilizado às plantas em quantidades suficientes e o nitrogênio atmosférico (N₂) não pode ser utilizado diretamente pelas plantas, devido à forte ligação que existe entre os átomos de nitrogênio da molécula. Assim, uma característica importante do feijoeiro é sua capacidade de interagir com bactérias diazotróficas, que em simbiose são capazes de realizar o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) (ARAUJO *et al.*, 1996; DALLA´AGNOL *et al.*, 2014).

A FBN é realizada por microrganismos capazes de assimilar o N₂, disponibilizando o N em formas assimiláveis às plantas e contribuindo para uma maior produção da cultura. Esses microrganismos podem ser de vida livre, associativos, endofíticos ou simbiontes; estes últimos são aqueles que estabelecem uma relação íntima com a planta, formando estruturas especializadas, os nódulos. Este grupo de microrganismos é conhecido como rizóbios. Devido ao processo eficaz realizado por estas bactérias, é estimado que a maior parte do fluxo de nitrogênio fixado biologicamente na natureza seja realizado por elas (KAHINDI *et al.*, 1997).

Dentre os rizóbios simbiontes de feijoeiro descritos atualmente, a maioria pertence ao gênero *Rhizobium*, já tendo sido relatada a simbiose com mais de 20 espécies descritas (LPSN, 2017), além de prováveis grupos novos; essas bactérias podem beneficiar a produção da cultura, gerando economia para os produtores e minimizando danos ecológicos causados pelo uso de fertilizantes nitrogenados.

Diversos estudos têm permitido a identificação e a classificação desses microrganismos por técnicas de sequenciamento de DNA e análises filogenéticas, resultando em maior compreensão da relação filogenética entres estes organismos, bem como permitindo a descoberta de estirpes de interesse biotecnológico, ecológico e agrônômico (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009; ROMA NETO; RIBEIRO; HUNGRIA, 2010; DALL'AGNOL *et al.*, 2013; MNASRI *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015).

A taxonomia polifásica é extensivamente utilizada para a classificação de novas espécies de microrganismos, onde diferentes metodologias são utilizadas para o agrupamento de dados referentes às características fenotípicas, genéticas e filogenéticas dos microrganismos em estudo (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; TINDALL *et al.*, 2010). Dentre as metodologias para a análise filogenética, são empregados estudos do gene ribossomal 16S e de genes *housekeeping*, os quais correspondem a genes codificadores de proteínas do metabolismo basal dos microrganismos. Neste último caso, a técnica é chamada de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e os genes são selecionados de acordo com características específicas, como estarem amplamente distribuídos no grupo em estudo, estarem presentes no genoma em uma única cópia, conterem tamanho suficiente para o sequenciamento e informações para análise (THOMPSON; GIBSON; HIGGINS, 2002; ZEIGLER, 2003; GEVERS *et al.*, 2005; MAIDEN, 2006; VANDAMME; PEETERS, 2014; GLAESER; KÄMPFER, 2015).

A metodologia de MLSA tem sido cada vez mais utilizada como ferramenta para inferir relações filogenéticas de diversas espécies de procariotos, incluindo os rizóbios. Outras técnicas, como o sequenciamento do genoma completo, também têm sido utilizadas, auxiliando na classificação destes microrganismos. Dessa forma, o uso de técnicas eficazes para a taxonomia de procariontes tem avançado consideravelmente, contribuindo para a caracterização e classificação dos microrganismos com maior rapidez e eficácia, podendo, assim, beneficiar a sociedade.

O Brasil é reconhecido como um país com alta diversidade de espécies animais, vegetais e microbianas, incluindo os rizóbios, que por sua vez são de grande importância para a sustentabilidade agrícola do país. Desse modo, o conhecimento da diversidade, filogenia e taxonomia de rizóbios para a cultura do feijoeiro é de extrema importância para o Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a posição taxonômica e as relações filogenéticas de três estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium* que estabelecem simbiose com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e que foram isoladas do principal centro de origem/diversidade genética da planta hospedeira, o México

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as relações evolutivas das estirpes por meio da construção de árvores filogenéticas com os genes 16S RNAr, *recA*, *glnII*, *gyrB* e *rpoA*, individualmente e por MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*);
- b) Realizar avaliações fenotípicas nas estirpes CNPSo 661, 666 e 668;
- c) Realizar a genotipagem das estirpes pelo perfil de DNA por rep-PCR;
- d) Avaliar as relações evolutivas dos genes de fixação de nitrogênio *nifH* e de nodulação *nodC* nas estirpes do estudo;
- e) Conduzir uma análise polifásica dos dados genotípicos, fenotípicos e filogenéticos obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FEIJOEIRO COMUM

As leguminosas estão entre as espécies vegetais de maior importância para a humanidade, presentes em ecossistemas naturais, agrícolas e agroflorestais. São ricas em proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras, vitaminas do grupo B e minerais, com diversas espécies utilizadas para o consumo humano e de animais. Acredita-se que a combinação entre leguminosas e cereais contém todos aminoácidos necessários para a dieta humana (KADAM; SALUNKHE, 1989; GRAHAM; VANCE, 2003; EJIGUI *et al.*, 2007; PAUL *et al.*, 2008).

As leguminosas compõem uma parcela da produção agrícola mundial, sendo responsáveis por parte do nitrogênio necessário para a saúde do homem. Na sociedade brasileira, os grãos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) têm grande importância pois são típicos da culinária nacional, estando presentes em refeições de, aproximadamente, 90 % da população, chegando a 19 kg de feijão/pessoa/ano (BARBOSA, 2007; MAPA, 2017).

O gênero *Phaseolus* compreende diferentes espécies, sendo a mais popular e cultivada a *Phaseolus vulgaris* L., ou feijoeiro comum, com variedades como o Carioca, Roxo, Mulatinho, Preto, entre outros. Representa uma ótima fonte de nutrientes, contribuindo com 10 a 20 % dos nutrientes totais necessários na dieta de um adulto, como minerais (Fe, Ca, Mn, Mg, Cu, Zn e K), carboidratos e lipídeos, além de possuir entre 20 a 25 % do teor de proteína, variando de acordo com o tipo de feijão (DURIGAN; SGARBIERI; BULISAN, 1987; BASSINELLO, 2001 *apud* BONETT *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2005).

O feijoeiro apresenta boa adaptação edafoclimática, podendo ser cultivado em diferentes tipos de solo e clima, sendo relevante para seu rendimento a temperatura, a precipitação pluvial e a radiação solar. O Brasil é o maior produtor mundial de grãos de *P. vulgaris*, com uma produção estimada em 3.418,3 mil toneladas até o final da terceira safra de 2017, superando em 36 % a safra de 2015/2016 (CONAB, 2017; IBGE, 2017; MAPA, 2017). Entretanto, é uma planta sensível a condições climáticas extremas, como extremos de temperaturas, elevadas ou baixas e ventos fortes, exigindo cultivares melhoradas geneticamente, manejo adequado do solo e tolerância a doenças (ARAUJO *et al.*, 1996).

3.2 NITROGÊNIO E O PROCESSO DE FBN

O N é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas (BISSANI *et al.*, 2008). As principais fontes para a assimilação de N pelos organismos na natureza são pela decomposição da matéria orgânica, descargas elétricas, combustão, vulcanismo, fertilizantes nitrogenados, ou pela fixação biológica do nitrogênio (FBN). O N é importante para o desenvolvimento vegetativo de diversas plantas, para a produção de órgãos reprodutivos e para a formação das sementes (GALLO; MIYASAKA, 1961; ANDRADE *et al.*, 1998; COELHO *et al.*, 1998; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007).

Este elemento está relacionado com a constituição da matéria orgânica das plantas, participando na formação de moléculas fundamentais como aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofila e outros (HUNGRIA *et al.*, 1994; GARCIA; CARDOSO; SANTOS, 2013). Sua deficiência inibe o crescimento vegetal e reflete em clorose e no acúmulo de carboidratos não metabolizados (KERBAUY, 2008).

O N está presente na natureza como N molecular ou atmosférico (N_2), íon nitrato (NO_3^-), amônia (NH_3), ou em compostos orgânicos nitrogenados. É abundante na atmosfera, representando 78 % de sua constituição, porém, nesse estado não está disponível às plantas e animais, devido à tripla ligação covalente entre os átomos de N, a qual é muito forte (HUNGRIA *et al.*, 1994; GALLOWAY *et al.*, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2004; NEWTON, 2015).

O N proveniente da matéria orgânica pode ser esgotado rapidamente após sua mineralização. Já o N disponibilizado pelo fertilizante nitrogenado pode ser assimilado com maior rapidez, porém, somente parte dele é absorvido pelas plantas, sendo o restante perdido pelos processos de lixiviação e erosão, acarretando na contaminação de rios, lagos e lençóis freáticos, bem como por volatilização e desnitrificação, enquanto parte permanece no solo na forma orgânica. Além disso, os fertilizantes nitrogenados são sintetizados a partir do petróleo, relacionados indiretamente com a poluição do meio ambiente e o esgotamento de fonte de energia não-renovável (CANTARELLA; DUARTE, 2004; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007; VARGAS, 2010).

A FBN é o processo bioquímico realizado por bactérias diazotróficas, no qual o N presente na atmosfera é convertido em formas químicas capazes de serem

utilizadas pelas plantas, em especial por espécies importantes para agricultura como a soja (*Glycine max* L.), o feijoeiro, a ervilha (*Pisum sativum* L.), o milho (*Zea mays* L.), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), entre outras. Desta forma, a FBN é considerada o segundo processo biológico de maior importância para as plantas, atrás apenas da fotossíntese (GRAHAM; VANCE, 2003).

A FBN é executada por procariontes diazotróficos que apresentam um complexo enzimático capaz de quebrar a tripla ligação do N_2 , convertendo-o em NH_3 (VAN BERKUM *et al.*, 2012). Esses organismos são encontrados na natureza em quatro diferentes situações: vida livre (fixam o N_2 para seu próprio uso sem necessidade de outro organismo), associativas (disponibilizam o nutriente para a planta sem desenvolver estruturas diferenciadas), endofíticas (vivem no interior de raízes e parte aérea das plantas) e simbióticas, popularmente conhecidas como rizóbios (induzem a formação de nódulos nas raízes da planta) (TAIZ; ZEIGER, 2004; GRAY; SMITH, 2005; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007; MOREIRA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012).

Para ocorrer a interação entre os rizóbios e as leguminosas, o processo se inicia com a troca de sinais químicos. A planta hospedeira exsuda moléculas como os flavonoides, que atraem as bactérias para a região da rizosfera. Em seguida, os rizóbios produzem oligossacarídeos lipo-quitínicos, denominados fatores Nod, que são responsáveis pelo reconhecimento entre a planta e a bactéria, e induzem alterações nas células do córtex da raiz (LONG, 1996; SCHULTZE; KONDOROSI, 1998; PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Após a entrada das bactérias via pelos radiculares, ou por fendas em algumas leguminosas, elas se multiplicam e são envoltas por uma membrana derivada do plasmalema. No seu interior, as bactérias irão multiplicar-se e sofrerão alterações morfológicas e bioquímicas, passando a ser denominadas bacteroides (NEWCOMB, 1981; HUNGRIA *et al.*, 1994).

Os bacteroides possuem o complexo enzimático dinitrogenase, responsável pela quebra do N_2 em NH_3 . A dinitrogenase é formada pela Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína). Durante a reação de redução do N_2 , a dinitrogenase e a ferridoxina reagem, transferindo elétrons para a unidade da Fe-proteína que, em seguida, doa elétrons para a MoFe-proteína, reduzindo o N_2 a NH_3 (MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995). Este processo

ocorre em anaerobiose, uma vez que a presença do oxigênio (O₂) pode inativar o complexo (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A inoculação com estirpes rizóbios selecionadas para maiores taxas de FBN em culturas de importância agrícola busca contribuir com o aumento de sua produtividade, diminuição do uso de adubo químico e maior economia para o agricultor, apresentando diferentes respostas para cada genótipo do cultivar às espécies e estirpes de *Rhizobium* (FERREIRA *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2012).

No Brasil, resultados obtidos em safras de feijões do grupo Carioca, Pérola e Diamante Negro apresentaram aumento na produtividade entre 8,2 e 35,5 % quando inoculados com a estirpe de *Rhizobium freirei* (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2003; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; YAGI *et al.*, 2015). Em outros estudos, em que a cultivar BRSMG Talismã foi inoculada com as estirpes CIAT 899 e UFLA 02-68, houve incremento na produtividade de grãos de 130,9 % e de 28 %, respectivamente (SOARES *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009). Resultados similares, de incremento no rendimento de grãos do feijoeiro pela inoculação com estirpes elite também foram relatados em estudos realizados por Ferreira *et al.*, 2000; Venturini *et al.*, 2002 e Bellaver; Fagundes, 2009 no Brasil e, também, para feijoeiros inoculados com estirpes nativas de rizóbios no Quênia, África (KOSEY *et al.*, 2017).

Os resultados da FBN variam de acordo com as características de solo, clima, cultivar, estirpe e manejo, entretanto, os estudos demonstraram que a inoculação possui capacidade para substituir o uso de adubos nitrogenados, permitindo o crescimento da agricultura sustentável e maior desenvolvimento econômico para o país, necessitando de maiores investimentos e incentivo para pesquisas nesta área.

3.3 TÉCNICAS MOLECULARES PARA CLASSIFICAÇÃO DE NOVA ESPÉCIE BACTERIANA

A metodologia de análise utilizada na sistemática microbiana depende do nível de resolução taxonômica de cada técnica e do objetivo do estudo, bem como do número de estirpes da espécie e das condições na aplicabilidade da técnica (ZAKHIA; LAJUDIE, 2001).

Para determinar as relações de um grande grupo de indivíduos, a molécula de estudo deve ser amplamente distribuída nos seres vivos e muitas vezes altamente

conservada. Em 1977 foi proposto o uso de sequências de RNAr das subunidades ribossômicas 16S para os procariontes e 18S para os eucariontes (WOESE; FOX, 1977). Acredita-se que as substituições nucleotídicas no DNA são diretamente proporcionais ao tempo evolutivo transcorrido na diferenciação das espécies, permitindo estimar a relação natural entre os microrganismos, refletindo a história evolutiva pelo tempo e o grau de divergência entre as espécies (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; HARRIS *et al.*, 2003; LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005).

O gene ribossomal 16S é um marcador importante para procariontes devido a sua universalidade, por estar envolvido na síntese proteica e ser a sequência gênica com maior número de dados depositados publicamente. Entretanto, por serem altamente conservadas, divergências evolutivas ocorridas entre as estirpes, e mesmo entre espécies em determinados gêneros, podem não ser identificadas (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; GEVERS *et al.*, 2005; BERRADA; FIKRI-BENBRAHIM, 2014).

Extensivamente utilizadas, as sequências deste gene em estirpes que apresentavam similaridade inferior a 97 % em relação às estirpes tipo e espécies relacionadas poderiam representar uma nova espécie. Já em 2006, após estudos com mais de 300 amostras revisadas por Stackebrandt e Ebers foi proposto que o valor para distinguir espécies estudando o gene 16S RNAr seja de 98,7 %. Este novo valor exclui amostras com sequências de má qualidade, dando maior confiabilidade e precisão a descrição de espécies (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Considerando-se o nível de espécie na classificação do microrganismo, é requerido que a estirpe alvo de estudo apresente 70 %, ou mais, de similaridade com a estirpe de referência por hibridação do DNA-DNA (HDD) e 5°C, ou menos, de diferença de temperatura de desnaturação da dupla fita entre os híbridos e homólogos para que a estirpe em estudo seja definida como pertencente àquela espécie (WAYNE *et al.*, 1987; VANDAMME *et al.*, 1996; GEVERS *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2011).

A HDD permite comparar genomas entre diferentes organismos, avaliando sua similaridade, permitindo inferir se os genomas pertencem à mesma espécie de bactérias, sendo bastante utilizada na taxonomia de procariontes. Essa metodologia, porém, apresenta variações nos valores reproduzidos em laboratórios distintos e é

um procedimento de alto custo e bastante laborioso (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; ROSSELLÓ-MORA *et al.*, 2011; MEIER-KOLTHOFF; KLENK; GÖKER, 2014).

Novas metodologias são propostas para complementar os resultados obtidos nas análises de HDD e do gene ribossomal 16S. É sugerido o uso de genes codificadores de proteínas conservadas, também denominados genes *housekeeping*, como marcadores alternativos, capazes de mostrar maior grau de divergência entre as espécies. Buscando eliminar erros gerados pela recombinação genética, é importante o uso desses genes de forma concatenada, ou seja, agrupados para análise (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; MARTENS *et al.*, 2007; LARANJO; YOUNG; OLIVEIRA, 2012; VAN BERKUM *et al.*, 2012).

A técnica de MLSA é designada para estudos filogenéticos, taxonômicos e delineamento das espécies dentro do gênero. Ela utiliza genes presentes em todas as células do organismo, responsáveis pela sua manutenção básica em condições normais e são denominados genes *housekeeping*. Para realização da técnica é indicado concatenar o maior número possível destes genes. Estudos apresentaram eficácia utilizando entre doze, oito, cinco e três genes *housekeeping* (GEVERS *et al.*, 2005; KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; 2007; KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006; MAIDEN, 2006; SCHLEIFER, 2009; KÄMPFER; GLAESER, 2012; DALL'AGNOL *et al.*, 2013; GLAESER; KÄMPFER, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2009; 2013; 2015).

Outra técnica para especiação é analisar o conteúdo G+C que define as proporções entre guanina (G) e citosina (C) do genoma do microrganismo. A interação entre estes nucleotídeos ocorre por meio de tripla ligação de hidrogênio, apresentando maior estabilidade, quando comparada à ligação entre adenina (A) e timina (T). O cálculo do conteúdo G+C se dá pela soma de G+C dividido pela soma de A+G+C+T, onde para os Domínios Archaea e Bacteria foram obtidos valores entre 17 % e 75 %. Quando as porcentagens apresentam diferenças acima de 3 a 5 mol % correspondem a espécies distintas taxonomicamente (DE LEY, 1970; ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001; GERHARDT; LEMKE; CORSO, 2006; YAKOVCHUK; PROTOZANOVA; FRANK-KAMENETSKII, 2006; MESBAH; WHITMAN; MESBAH, 2011; VAN STRAALLEN; ROELOFS, 2012; BROCCIERI, 2014; ANDRIGHETTI, 2015).

Além da execução das técnicas já descritas, é interessante realizar o estudo filogenético com os genes 'acessórios' de interesse específico de alguns

microrganismos. No caso dos rizóbios, aqueles responsáveis pela nodulação (grupo de genes *nod*) ou fixação do nitrogênio (grupo de genes *nif*), presentes nos plasmídeos ou em ilhas simbióticas no cromossomo

Recentemente, diversos trabalhos foram publicados inferindo a necessidade de revisão sobre o uso da taxonomia polifásica, explanando a necessidade de técnicas mais rápidas, baratas e eficazes, como o uso de dados gerados pelo sequenciamento completo de genomas (RAMASAMY *et al.*, 2014; THOMPSON *et al.*, 2015; VANDAMME; PEETERS, 2014).

O sequenciamento completo de genomas traz novas perspectivas para a taxonomia de procariontes, promovendo uma resolução genotípica mais discriminatória entre as espécies, sendo denominada como era genômica, na qual são englobadas metodologias como a assinatura genômica (AUCH *et al.*, 2010), identidade média de amino ácidos (ROHWER; EDWARDS, 2002), análise de super árvores (BROWN *et al.*, 2001) e identidade média de nucleotídeos (ANI) (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005), dentre outros (PREHEIM; TIMBERLAKE; POLZ, 2011).

A metodologia de ANI compara a similaridade entre sequências genômicas inteiras de duas espécies, gerando um resultado bastante conciso sobre a genética e a distância evolutiva entre as espécies. O valor de ANI é dado em porcentagem e, quando é inferior a 95 %, as estirpes em estudo podem representar espécies distintas (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; RICHTER *et al.*, 2016).

Os resultados da análise de ANI apresentam correlação alta com os resultados obtidos pela análise do gene 16S RNAr, diminuem o fator de transferência lateral de genes e permitem a distinção entre os microrganismos no nível de subespécies. A metodologia tem sido utilizada com frequência, permitindo identificar espécies com maior rapidez. Além disso, estudos comparando resultados obtidos por ANI e HDD concluíram que a análise por ANI pode substituir fielmente a técnica de hibridação (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; GORIS *et al.*, 2007; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009).

Assim, para descrição de uma nova espécie é necessário seguir os padrões exigidos pelo comitê internacional de taxonomia, responsável pela publicação ou validação dos novos nomes no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM), publicação da *Society for General Microbiology* (SGM). As “estirpes tipo” devem ser estudadas juntamente com as espécies de grupos

relacionados, ou espécies de referência e estar depositada em pelo menos duas coleções de cultura de países diferentes e que seus números de acesso estejam descritos no artigo (IJSEM, 2016).

A estirpe deve ser estudada pelas metodologias empregadas em análises polifásicas, buscando avaliar diversidades intra e interespecíficas. São necessárias análises pela HDD (hibridização DNA-DNA) e por técnicas de *fingerprinting* entre a espécie nova e as espécies de referência, com maior similaridade genética. A revista encoraja a substituição da HDD pela *Average nucleotide identity* (ANI), técnica que analisa a similaridade total entre genomas de duas estirpes próximas. O gene 16S RNAr deve conter pelo menos 1300 nucleotídeos, e a sequência deve ser disponibilizada em um banco de dados público como o NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (IJSEM, 2016).

Recomenda-se que o trabalho tenha dados de marcadores quimiotaxonômicos, como o perfil de ácidos graxos. Também é necessário incluir a porcentagem de conteúdo G+C da nova espécie e um estudo pelo MLSA pode ser conduzido. Por fim, um nome deve ser proposto, obedecendo às normas do *International Code of Nomenclature of Prokaryotes*, junto com uma descrição das informações necessárias para a identificação da nova espécie (IJSEM, 2016).

3.4 GENES NOD E NIF

Genes auxiliares podem estar presentes em plasmídeos ou ilhas genômicas e, no caso dos rizóbios, incluem genes envolvidos na simbiose entre esses microrganismos e a leguminosa. Para o processo da nodulação, estão envolvidos os genes de nodulação *nod*, *nol* e *noe*, e da fixação do nitrogênio *nif* e *fix*. Entretanto, esses genes são susceptíveis à transferência entre plasmídeos ou entre ilhas genômicas (ROGEL *et al.*, 2001; NAKATSUKASA *et al.*, 2008; BROOHAERTS *et al.*, 2005; ESTRELLA *et al.*, 2009).

Os genes *nod* são responsáveis pela síntese de fatores Nod (lipo-quitoligossacarídeos) essenciais à nodulação; esses fatores são sintetizados pelas bactérias em resposta a moléculas indutoras exsudadas pela planta hospedeira, em geral flavonoides (BROUGHTON; JABBOURI; PERRET, 2000). Os principais genes dos rizóbios responsáveis pela síntese dos fatores Nod são os *nodA*, *nodB* e *nodC*, além de outros genes específicos de cada espécie, que contribuem com diferentes

radicais dos fatores Nod. O gene chave para a síntese é o *nodD*, que regula o operon *nodABC*, sendo essencial para ocorrer a nodulação e, em alguns casos, determinante da especificidade hospedeira (WINSOR, 1989; SCHLAMMAN; OKKER; LUGTENBERG; 1992; RELIC *et al.*, 1994; ROCHE *et al.*, 1996). O gene *nodC* codifica a N-acetilglucosaminatranferase, quitina responsável pela cadeia do fator *Nod*, fator decisivo no reconhecimento entre o rizóbio e a planta hospedeira (SCHLAMMAN; PHILLIPS; KONDOROSI, 1998; LAGUERRE *et al.*, 2001).

Além dos genes envolvidos no processo de nodulação, alguns genes participam no mecanismo de fixação, sendo utilizados para estudar as relações entre espécies de rizóbio, denominados *nif* (*nitrogen fixation*), incluindo genes estruturais, de biossíntese e regulação da dinitrogenase (GLICK, 2012; LINDSTRÖM; ASERSE; MOUSAVI, 2015). Dentre esses, o gene *nifH* é responsável por codificar a subunidade dinitrogenase redutase (FISCHER, 1994).

Na maioria dos casos, os genes *nod* e *nif* estão presentes em rizóbios e permitem diferenciá-los de outros microrganismos capazes de ocuparem endofiticamente leguminosas (SILVA *et al.*, 2005; VINUESA *et al.*, 2005; GIRAUD *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2009). São utilizados, com frequência, para a descrição de novas espécies de rizóbios (ZHANG *et al.*, 2015; AKTER *et al.*, 2016; DE MEYER *et al.*, 2016).

3.5 TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS

Taxonomia é a ciência responsável pela ordenação dos organismos em taxas, ou seja, pela classificação destes de acordo com a similaridade entre eles, identificando e diferenciando espécies de importância clínica, ambiental e industrial. Possui, como pontos-chave, a identificação, a classificação e a nomenclatura dos organismos. No caso das bactérias, a taxonomia segue os padrões estabelecidos pelo *International Code of Nomenclature of Bacteria* (LAPAGE *et al.*, 1992; GEVERS *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 2010; TINDALL *et al.*, 2010).

A princípio, a caracterização de espécies bacterianas era baseada somente em características fenotípicas, como a forma e a coloração das colônias, seguida pela análise de propriedades fisiológicas, como a capacidade de utilização de fontes de carbono (RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁSQUEZ, 2009; MOORE *et al.*, 2010; OREN; GARRITY, 2014). Desse modo, quando o cientista Bergey publicou a

primeira versão do *Bergey's Manual*, eram utilizadas apenas estas características fenotípicas para sua classificação em diferentes gêneros e espécies. No caso dos rizóbios, uma primeira classificação foi baseada na propriedade de estabelecer simbiose com o respectivo hospedeiro, a chamada "inoculação cruzada", além de outras propriedades fenotípicas, onde todas as espécies foram posicionadas no gênero *Rhizobium* (FRED; BALDWIN; McCOY, 1932). Assim, a capacidade dos rizóbios em formar nódulos nas respectivas leguminosas hospedeiras foi essencial para diferenciar espécies dentro do gênero *Rhizobium*, permitindo a descrição de seis espécies em 1974, na edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (BERGEY *et al.*, 1923; VINCENT, 1970; JORDAN; ALLEN, 1974; SKERMAN; McGOWAN; SNEATH, 1980). Contudo, a classificação com base na nodulação do hospedeiro também apresentava limitações, pois há plantas denominadas "promíscuas", como o feijoeiro, com a capacidade de realizar simbiose com diferentes espécies de rizóbios.

Posteriormente, o grupo de rizóbios foi dividido em dois gêneros, com base na velocidade do crescimento em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono, separando as bactérias em dois gêneros, *Rhizobium* (crescimento rápido) e *Bradyrhizobium* (crescimento lento) (JORDAN, 1984).

Com a evolução da tecnologia novos métodos para o estudo taxonômico foram desenvolvidos e permitiram a obtenção de novos e diferentes dados para identificação de uma espécie. Proposta em 1991, a taxonomia polifásica é utilizada para descrição de microrganismos por meio dos resultados obtidos referentes as suas características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (GRAHAM *et al.*, 1991; VANDAMME *et al.*, 1996; STACKEBRANDT *et al.*, 2002; TINDALL *et al.*, 2010).

Algumas das avaliações fenotípicas realizadas para a caracterização de procariotos incluem as condições necessárias para o crescimento, como temperatura, pH, salinidade, coloração de Gram, morfologia da célula (tamanho, forma, elevação, textura, cor, opacidade, emulsificação), motilidade, perfil de ácidos graxos, fontes de carbono, entre outras (COHN, 1872 *apud* DREWS, 2000; ORLA-JENSEN, 1909 *apud* RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁSQUEZ, 2009; MOORE *et al.*, 2010; OREN; GARRITY, 2014). Essas características proporcionam informações sobre o microrganismo, representando a primeira etapa para prosseguir com a sua descrição, além de serem requisitos mínimos para apresentar uma nova espécie

bacteriana, exigidos pelo *Bergey's Manual Trust* (KUYKENDALL *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 2010).

Dentre as metodologias para analisar o fenótipo dos microrganismos, o uso dos perfis de ácidos graxos é amplamente utilizado na descrição de espécies. Essa metodologia considera que grupos microbianos possuem diferentes concentrações destes compostos químicos, servindo como marcadores biológicos capazes de distinguir espécies dentro de uma comunidade (FERNANDES; CHAER, 2010). Estirpes que apresentam proporções relativas semelhantes de ácidos graxos são consideradas como semelhantes. Como exemplo, espécies do gênero *Rhizobium* apresentam os compostos C_{16:0}, C_{18:0}, C_{19:0} cyclo w8cis e C_{20:3w6,9,12cis} em comum. Diferentes concentrações desses compostos, em adição a resultados de técnicas filogenéticas, permitem distinguir os organismos em espécies (TIGHE *et al.*, 2000).

Os resultados fenotípicos são importantes, porém, podem variar de acordo com o meio de cultura e as condições utilizadas para o crescimento do microrganismo. Além disso, as características codificadas por genes presentes nos plasmídeos (capacidade de degradabilidade, produção de melanina, motilidade, entre outras) podem não ser expressas pela perda do plasmídeo, falhando em elucidar a relação evolutiva entre as espécies, sua diferenciação, sendo necessária a realização de outras análises (MOORE *et al.*, 2010; ORMEÑO-ORRILLO; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013).

Com o desenvolvimento de metodologias capazes de estudar o genótipo, ou seja, analisar as informações do DNA e/ou RNA, passou a ser possível identificar e classificar novas espécies além de suas características fenotípicas ou simbióticas. A técnica molecular referente ao 16S RNAr, por exemplo, foi um marco na taxonomia dos seres vivos do Reino Monera, passando a ser indispensável para sua classificação (WOESE *et al.*, 1984; GRAHAM *et al.*, 1991).

Atualmente, os microrganismos conhecidos como rizóbios estão classificados dentro da classe Alfa-Proteobacteria dentro dos gêneros *Allorhizobium* (4), *Aminobacter* (6), *Azorhizobium* (3), *Bradyrhizobium* (33), *Devosia* (21), *Ensifer* (20), *Mesorhizobium* (43), *Methylobacterium* (52), *Microvirga* (12), *Neorhizobium* (3), *Ochrobactrum* (18), *Pararhizobium* (4), *Phyllobacterium* (11), *Rhizobium* (103), *Shinella* (7) e, na classe Beta-Proteobacteria, nos gêneros *Cupriavidus* (16) e *Paraburkholderia* (62) (PEIX *et al.*, 2014; LPSN, 2017).

Dentre as espécies descritas de bactérias diazotróficas do gênero *Rhizobium*, até 2017, 18 foram isoladas de nódulos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), citadas a seguir: *R. leguminosarum* (JORDAN, 1984), *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), *R. etli* (SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993), *R. gallicum* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997), *R. rhizogenes* (YOUNG *et al.*, 2001), *R. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2006), *R. phaseoli* (RAMÍREZ-BAHENA *et al.*, 2008), *R. endophyticum* (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2010), *R. vallis* (WANG *et al.*, 2011), *R. leucaenae*, (RIBEIRO *et al.*, 2012), *R. mesoamericanum* (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2012), *R. freirei* (DALL´AGNOL *et al.*, 2013), *R. azibense* (MNASRI *et al.*, 2014), *R. paranaense* (DALL´AGNOL *et al.*, 2014), *R. ecuadorensis* (RIBEIRO *et al.*, 2015), *R. acidisoli* (ROMÁN-PONCE *et al.*, 2016) e *R. hidalgonense* (YAN *et al.*, 2017). Além disso, outras cinco espécies são capazes de formar nódulos efetivos em feijoeiro quando inoculadas: *R. pisi* (RAMÍREZ-BAHENA *et al.*, 2008), *R. alkalisoli* (LU *et al.*, 2009), *R. tibeticum* (HOU *et al.*, 2009), *R. sophorae* e *R. sophoriradicis* (JIAO *et al.*, 2015). Outras espécies, como *R. anhuiense* (ZHANG *et al.*, 2015) e *R. giardinii* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997) formam nódulos inefetivos. Além disso, beta-rizóbios também nodulam o feijoeiro (DALL´AGNOL *et al.*, 2017).

No Brasil, em solos ácidos, estirpes de *R. tropici* representam a maior porcentagem dentre os rizóbios isolados de nódulos de feijoeiro a campo, apresentando alta adaptabilidade às condições edafoclimáticas, maior estabilidade genética, tolerância a estresses de temperatura e acidez e alta capacidade de nodulação, sendo considerada uma estirpe de referência e autorizada para produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro no país (GRAHAM, 1992; CHUEIRE *et al.*, 2000; HUNGRIA *et al.*, 2000). Já em regiões do Equador e México, conhecidas como centros de diversidade genética de feijoeiro, verificou-se maior abundância de isolados da espécie *R. etli* como microssimbiontes do feijoeiro e o mesmo foi observado no centro genético secundário, a Argentina. Estes estudos permitem a descoberta de espécies com maior potencial para promover a produtividade entre as culturas importantes para a sociedade e a economia do país (BERNAL, 1993; SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012).

Assim, à medida que novas metodologias e ferramentas como o uso da molécula do 16S RNAr e o estudo do genoma para identificação e descrição de espécies procariontes são desenvolvidas e aplicadas na taxonomia, aumentamos a

possibilidade de descobrir novas espécies de utilidade para a agricultura, indústria alimentícia, bioremediação entre outras, além de permitir maior compreensão da história evolutiva de cada organismo. Há estimativas de que ainda inúmeras espécies de organismos procariontes sejam descritos considerando a diversidade de ambientes para serem estudados.

3.7 REFERÊNCIAS

- AKTER, M. S., *et al.* Molecular characterization of rhizobial isolates from *Sesbania bispinosa*. **Bioresearch Communications**, v.2, n.1, p.164-169, 2016.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- ANDRADE, M. J. B., *et al.* Influência do nitrogênio, rizóbio e molibdênio sobre o crescimento, nodulação radicular e teores de nutrientes no feijoeiro. **Revista Ceres**, v.45, n.257, p.65-79, 1998.
- ANDRIGHETTI, T. **Ferramenta computacional para identificação de micro-organismos com base em assinaturas genômicas**. 2015. 53 fls. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu. 2015.
- ARAUJO, R. S., *et al.* **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. 786 p.
- AUCH, A. F., *et al.* Digital DNA–DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in Genomic Sciences**, v.2, p.117–134, 2010.
- BARBOSA, L. Feijão com arroz e arroz com feijão: o Brasil no prato dos brasileiros. **Horizontes Antropológicos**, v.13, n.28, p.87-116, 2007.
- BELLAVER, A.; FAGUNDES, R.S. Inoculação com *Rhizobium tropici* e uso do nitrogênio na base e por cobertura na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Cultivando o saber, Cascavel**, v. 2, n. 4, 2009. p. 1-10.
- BERGEY, D. H., *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1923. 442p.
- BERNAL, G. R. **Characterization of Ecuadorian and Argentine bean rhizobia and their specificity with *Phaseolus vulgaris* L. of different gene pools**. 1993. 59 fls. M.S. thesis. University of Minnesota, Minnesota. USA, 1993.

BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. **British Microbiology Research Journal**, v.4, n.6, p.616-639, 2014.

BISSANI, C. A., *et al.* **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. 2nd ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. 344 p.

BONETT, I. P., *et al.* Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v.11, n.3, p.235-246, 2007.

BROCCHIERI, L. The GC content of bacterial genomes. **Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology**, v.2, n.1, p.2-4, 2014.

BROOHTAERTS, W., *et al.* Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, v.433, p.629–633, 2005.

BROUGHTON, W. J. JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.20, p.5641–5652, 2000.

BROWN, J. R., *et al.* Universal trees based on large combined protein sequence data sets. **Nature Genetics**, v.28, p.281– 285, 2001.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C., MIRANDA, G. V. **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p.139-82.

GARCIA, G.; CARDOSO, A. A.; SANTOS, O. A. M. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, v.36, n.9, p.1468-1476, 2013.

CGIAR. Consultative Group on International Agricultural Research. **Common bean**. 2016. Disponível em: <<http://www.cgiar.org/our-strategy/crop-factsheets/beans/>>. Acesso em: 20 de Março de 2016.

COELHO, F. C., *et al.* Nitrogênio e molibdênio nas culturas do milho e do feijão, em monocultivos e em consórcio: efeitos sobre o feijão. **Revista Ceres**, v.45, n.260, p. 393-407, 1998.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – sexto levantamento**. v.3, n.6, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_03_11_15_20_36_boletim_graos_marco_2017.pdf>. Acesso em: 20 de Agosto de 2017.

CHUEIRE, L. M. O., *et al.* **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 32p. (Embrapa Soja. Boletim de Pesquisa 3).

- DALL'AGNOL, R. F., *et al.* *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p. 4167–4173, 2013.
- DALL'AGNOL, R. F., *et al.* *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.3222–3229, 2014.
- DALL'AGNOL, R. F., *et al.* Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v.93, n.4, 2017.
- DE LEY, J. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. **Journal of Bacteriology**, v.101, n.3, p.738–754, 1970.
- DE MEYER, S.E., *et al.* Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high-affinity cytochrome *cbb3* oxidase genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.29, n.8, p.609-619, 2016.
- DREWS, G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review**, v.24, n.3, p.225-249, 2000.
- DURIGAN, J. F.; SGARBIERI, V. C.; BULISANI, E. A. Protein value of dry bean cultivars; factors interfering with biological utilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.2, n.35, p.694-698, 1987.
- EJIGUI, J., *et al.* Improvement of the nutritional quality of a traditional complementary porridge made of fermented yellow maize (*Zea mays*): effect of maize-legume combinations and traditional processing methods. **Food and Nutrition Bulletin**, v.28, p.23–34, 2007.
- ESTRELLA, M. J., *et al.* Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.1088–1098, 2009.
- FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. **Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo**. 2010. 37p. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documento, 163).
- FERREIRA, A.N.; *et al.* *Rhizobium tropici* strains for inoculation of the common bean. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, 2000. p. 507-512.
- FERREIRA, P.A.A.; *et al.* Inoculação com cepas de rizóbios na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, 2009. p. 2210-2212.

FISCHER, M. H. Genetic regulation of nitrogen fixation rhizobia. **Microbiological Reviews**, v.58, p.352-386, 1994.

FRANCO, M.C.; *et al.* Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andinos e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, 2002. p. 1145-1150.

FRED, E.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plant**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343 p.

GALLO, J. R.; MIYASAKA, S. Composição química do feijoeiro e absorção de elementos nutritivos do florescimento à maturação. **Bragantia**, v.20. p.867-884, 1961.

GALLOWAY, J. N., *et al.* The nitrogen cascade. **Bioscience**, v.53, n.4, p.341-356, 2003.

GERHARDT, G. J. L.; LEMKE, N.; CORSO, G. Network clustering coefficient approach to DNA sequence analysis. **Chaos, Solitons and Fractals**, v.28, n.4, p.1037–1045, 2006.

GEVERS, D., *et al.* Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.733-739, 2005.

GIRAUD, E., *et al.* Legumes symbioses: Absence of *nod* genes in photosynthetic Bradyrhizobia. **Science**, v.316, p.1307-1312, 2007.

GLAESER, S. P.; KAMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v.38, p.237-245, 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v.2012, p.1-15, 2012.

GORIS, J., *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.81-91, 2007.

GRAHAM, P. H., *et al.* Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-nodulating and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.41, p.582–587, 1991.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *BradyRhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.475–484, 1992.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v.131. 872-877, 2003.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, n.3, p.395-412, 2005.

HARRIS, J. K., *et al.* The genetic core of the universal ancestor. **Genome Research**, v.13, p.407-412, 2003.

HOU, B. C., *et al.* *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Sirj.) Vassilcz. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.3051-3057, 2009.

HUNGRIA, M., *et al.* **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. p.9-89.

HUNGRIA, M., *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35).

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with eficiente and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, 2003. p. 88-93.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with Rhizobia and Azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, 2013. p. 791-801.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola – pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro. v.29, n.2, p.1-79, 2017. Disponível em:<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/Ispe_201702.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/Ispe_201702.pdf)>. Acesso em: 20 de Agosto de 2017.

IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/>. Acesso em: Nov, 2016.

JIAO, Y. S., *et al.* *RHIZOBIUM sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.497-503, 2015.

JORDAN, D. C. Family III – Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984.

JORDAN, D. C.; ALLEN, O. N. Family III - Rhizobiaceae Conn 1938. In: BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1974. p.261–267.

KADAM, S. S.; SALUNKHE, D. K. Production, distribution and consumption. In: SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. **CRC handbook of world food legumes: nutritional chemistry, processing technology and utilization**. Boca Raton, FL, CRC Press Inc., 1989. p. 5-23.

KAHINDI, J. H. P., *et al.* Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, v.6, n.1, p.55-76, 1997.

KÄMPFER, P., GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era - the polyphasic approach revisited. **Environmental Microbiology**, v.14, p.291-317, 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431p.

KONSTANTINIDIS, K. T., TIEDJE, J. M. Genomic insights into the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.2567–2572, 2005.

KONSTANTINIDIS, K. T., TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion on Microbiology**, v.10, p.504–509, 2007.

KONSTANTINIDIS, K. T., RAMETTE, A., TIEDJE, J. M. The bacterial species definition in the genomic era. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences**, v.361, p.1929-1940, 2006.

KOSKEY, G.; MBURU, S.W.; NJERU, E.M.; KIMITI, J.M.; OMBORI, O.; MAINGI, J.M. Potential of native rhizobia enhancing nitrogen fixation and yields of climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in contrasting environments of Eastern Kenya. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017. p. 443.

KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A. *Rhizobium*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STANLEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 2nd. ed. New York: Springer, 2005. p.324-361.

LAGUERRE, G., *et al.* Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v.147, p.981–993, 2001.

- LAPAGE, S.P., *et al.* **International Code for nomenclature of bacteria: Bacteriological Code**, 1990 Revision. Washington D.C., E.U.A.: ASM Press, 1992, [s.n.]. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8817/>>. Acesso em Out. 2016.
- LARANJO, M.; YOUNG, J. P. W.; OLIVEIRA, S. Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *MesoRhizobium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p. 359–367, 2012.
- LINDSTRÖM, K.; ASERSE, A. A.; MOUSAVI, S. A. Evolution and taxonomy of nitrogen fixing organisms with emphasis on rhizobia. In: DE BRUJIN, F.J. **Biological nitrogen fixation**, v.2. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2015, p. 21-38.
- LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.47, p.43-60, 2005.
- LONG, S. R. *RHIZOBIUM* symbiosis: Nod factors in perspective. **The Plant Cell**, v.8, n.10, p.1885-1898, 1996.
(não está citada no texto)
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., *et al.* *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, n.6, p.322-327, 2010.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., *et al.* *RHIZOBIUM grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea lepoina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria tenatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.2264-2271, 2012.
- LPSN. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em Outubro, 2017.
- LU, Y.L., *et al.* *RHIZOBIUM alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.3006-3011, 2009.
- MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.60, p.561-588, 2006.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Perfil do feijão no Brasil**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em 10 de Agosto de 2017.
- MARTENS, M., *et al.* Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.489-503, 2007.

MARTÍNEZ-ROMERO, E., *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, n.3, p.417-426, 1991.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v.252, n.1, p.11-23, 2003.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KLENK, H. P.; GÖKER, M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.352-356, 2014.

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.2934–2950, 2009.

MESBAH, N. M.; WHITMAN, W. B.; MESBAH, M. Determination of the G+C content of prokaryotes. In: RAINEY, F.; OREN, A. **Taxonomy of Prokaryotes**. Waltham, USA: Academic Press, 2011. p.299–324.

MNASRI, B., *et al.* *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.1501-1506, 2014.

MOORE, E. R. B., *et al.* Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons, **Research in Microbiology**, v.161, p.430-438, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.22, p.74-99, 2010.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, 1995.

NAKATSUKASA, H., *et al.* Transposon mediation allows a symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii to become a symbiosis island in *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.54, n.2, p.107–18, 2008.

NEWCOMB, W. Nodule morphogenesis and differentiation. **International Review of Cytology**, v.13, p.247-297, 1981.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation. In: SEIDEL, A.; BICKFORD, M. **Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology**. Blacksburg, USA: John Wiley and Sons Inc., 2015. p.1-51.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.106, n.1, p.43-56, 2014.

ORMEÑO-ORRILLO, E., *et al.* Change in land use alters the diversity and composition of *BradyRhizobium* communities and led to the introduction of *Rhizobium etli* into the tropical rain forest of Los Tuxtlas (Mexico). **Microbial Ecology**, v.63, n.4, p.822-834, 2012.

ORMEÑO-ORILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.145-147, 2013.

PAUL, K. H., *et al.* Soy and rice-based processed complementary food increases nutrient intakes in infants and is equally acceptable with or without added milk powder. **Journal of Nutrition**, v.138, p.1963–1968, 2008.

PEIX, A., *et al.* Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Science**, v.34, p.17-42, 2014.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.1, p. 180–201, 2000.

PIRES, C. V., *et al.* Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L). **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.16, n.2, p.157-162, 2005.

PREHEIM, S. P.; TIMBERLAKE, S.; POLZ, M. F. Merging taxonomy with ecological population prediction in a case study of *Vibrionaceae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.20, p.7195–7206, 2011.

RAMASAMY, D., *et al.* A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.384-391, 2014.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H., *et al.* Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889^{AL}, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926^{AL} and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{AL}. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2484-2490, 2008.

RAMOS, P. L., *et al.* An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.4, p.394-399, 2011.

RELIC, B., *et al.* Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. **Molecular Microbiology**, v.13, p.171-178, 1994.

RICHTER, M.; ROSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.106, n.45, p.19126-19131, 2009.

RICHTER, M., *et al.* JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v.32, n.6, p.929-931, 2016.

RIBEIRO, R. A., *et al.* Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* strains microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297-306, 2009.

RIBEIRO, R. A., *et al.* Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, n.5, p.1180-1185, 2012.

RIBEIRO, R. A., *et al.* Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Research in Microbiology**, v.164, p.740-748, 2013.

RIBEIRO, R. A., *et al.* *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.3162-3169, 2015.

RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁSQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v.2, p.51-69, 2009.

ROCHE, P., *et al.* The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.15305–10, 1996.

ROGEL, M.A., *et al.* Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.7, 3264–8, 2001.

ROHWER, F.; EDWARDS, R. The phage proteomic tree: a genome based taxonomy for phage. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.4529–4535, 2002.

ROMA NETO, I. V.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.1291–1302, 2010.

ROMÁN-PONCE, B., *et al.* *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, p.398-406, 2016.

ROSSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, n.1, p.39-67, 2001.

ROSSELLÓ-MÓRA, R., *et al.* **Methods in Microbiology: Taxonomy of Prokaryotes**. London: Elsevier, 2011. p.325- 347.

SCHLAMMAN, H. R. M.; OKKER, R. J. H.; LUGTENBERG, B. J. J. Regulation of nodulation gene expression by *nodD* in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.16, p.5177-5182, 1992.

SCHLAMMAN, H. R. M.; PHILLIPS, D. A.; KONDOROSI, E. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: SPAINK, H.P.; HONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. **The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.361-386.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, p.533-542, 2009.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v.32, p.33-57, 1998.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.

SILVA, C., *et al.* Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum sensu lato*, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. **Molecular Ecology**, v.14, n.13, p.4033-50, 2005.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**. v.30, p.225-420, 1980.

SOARES, A.L.L.; *et al.* Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões, MG. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 30, n. 5, 2006. p. 803-811.

SOUSA, A.S.; *et al.* Eficiência e resposta à aplicação de nitrogênio de genótipos de feijão comum cultivados em várzea tropical do Estado do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, 2012. p. 803-833

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

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v.33, n.4, p.152-155, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2004. 719p.

TIGHE, S. W., *et al.* Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.787-801, 2000.

TINDALL, B. J., *et al.* Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.249–266, 2010.

THOMPSON, C. C., *et al.* Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? **Archives of Microbiology**, v.197, n.3, p.359-370, 2015.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. In: BATEMAN, A.; DRAGHICI, S.; KHURANA, E.; ORCHARD, S.; PEARSON, W.R., eds. **Current protocols in bioinformatics**. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc., 2002. p.1-22.

VALVERDE, A., *et al.* *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2631-2637, 2006.

VAN BERKUM, P., *et al.* Development and application of a Multilocus Sequence Analysis method for the identification of genotypes within Genus *Bradyrhizobium* and for establishing nodule occupancy of soybean (*Glycine max* L. Merr). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.25, n.3, p. 321–330, 2012.

VANDAMME, P., *et al.* Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.

VANDAMME, P., PEETERS, C. Time to revisit polyphasic taxonomy. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.106, 1, p.57-65, 2014.

VAN STRAALLEN, N. M.; ROELOFS, D. **Introduction to ecological genomics**. London: Oxford, 2011. 416p.

VARGAS, V. P. **Manejo da adubação nitrogenada na recuperação de estresses em milho**. 2010. 146 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2010.

VENTURINI, S.F.; *et al.* Efeito da inoculação com *Rhizobium* e aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro. UFSM, **CCR**, Departamento de Solos, Santa Maria-RS, 2002. 4p.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

VINUESA, P., *et al.* Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n.8, p.702–716, 2005.

WANG, F., *et al.* *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2582-2588, 2011.

WANG, D.; SHENGMING, Y.; TANG, F.; ZHU, H. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. **Cellular Microbiology**, v.14, n.3, p.334-342, 2012.

WAYNE, L. G., *et al.* Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.37, p.463-464, 1987.

WEI, G., *et al.* Invasive *Robinia pseudoacacia* in China is nodulated by *MesoRhizobium* and *SinoRhizobium* species that share similar nodulation genes with native American symbionts. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v.68, p.320-328, 2009.

WINSOR, B. A. A *nod* at differentiation: the *nodD* gene product and initiation of *Rhizobium* nodulation. **Trends in Genetics**, v.5, n.7, p.199–201, 1989.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.74, n.11, p.5088-5090, 1977.

WOESE, C. R., *et al.* The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. **Systematic and Applied Microbiology**, v.5, p.315-326, 1984.

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

YAGI, R. *et al.* Nodulações e produtividades de grãos de feijoeiros diante a adubação nitrogenada ou da inoculação cm *Rhizobium freirei*. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 39, n. 6, 2015. p. 1661-1670.

YAKOVCHUK, P.; PROTOZANOVA, E.; FRANK-KAMENETSKII, M. D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. **Nucleic Acids Research**, v.34, n.2, p.564–574, 2006.

YAN, J., *et al.* *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. **Archives of Microbiology**, v.199, n.1, p.97-104, 2017.

YOUNG, J. M., *et al.* A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *AlloRhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.89-103, 2001.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v.25, p.569-576, 2001.

ZHANG, Y. J., *et al.* *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.2960-2967, 2015.

ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1893-1900, 2003.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO

New taxa – Proteobacteria

***Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils**

Andrey Barbosa Cordeiro,^{1,2,3} Renan Augusto Ribeiro,⁴ Luisa Caroline Ferraz Helene,^{1,3,5} and Mariangela Hungria^{1,2,4,5*}

¹Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970, Londrina, Paraná, Brazil

²Universidade Estadual de Londrina, Department of Microbiology, C.P. 10011, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil

³Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, SBN, Quadra 2, Bloco L, Lote 06, Edifício Capes, 70040-020, Brasília, Distrito Federal, Brazil

⁴Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, SHIS QI I Conjunto B, Blocos A,B,C e D, Lago Sul, 71605-001, Brasília, Distrito Federal, Brazil

⁵Universidade Estadual de Londrina, Department of Biochemistry and Biotechnology, C.P. 60001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil

*Corresponding author

Running title: *Rhizobium esperanzae* sp. nov.

New sequences of *Rhizobium esperanzae*: ***nodC*** of CNPSo 661 (KY748061), ***nodC*** of CNPSo 666 (KY748060), ***nodC*** of CNPSo 668^T (KY748059); ***nifH*** of CNPSo 661 (KY748058), ***nifH*** of CNPSo 666 (KY748057), ***nifH*** of CNPSo 668^T (KY748056).

Genome sequence of *Rhizobium esperanzae* CNPSo 668^T - SUBID: SUB2473249; BioProject: PRJNA378648; BioSample: SAMN06555453; Accession Organism: MXPU00000000, version MXPU01000000.

Abbreviations: NI, Nucleotide Identity; ANI, Average Nucleotide Identity; DDH, DNA-DNA hybridization; MLSA, multilocus sequence analysis.

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume consumed worldwide; its genetic origins lie in the Mesoamerican (main center) and Andean regions. It is promiscuous in establishing root-nodule symbioses; however, in the centers of origin/domestication, the predominant association is with *Rhizobium etli*. Previously, we identified a new lineage (PEL-3) comprising three strains (CNPSo 661, CNPSo 666 and CNPSo 668^T) isolated from root nodules of common bean in Mexico, and that were now analyzed in more detail. Sequences of the 16S rRNA gene positioned the three strains in a large clade including *R. etli*. Multilocus sequence analysis (MLSA) with four housekeeping genes (*recA*, *glnII*, *gyrB* and *rpoA*) positioned the three strains in a clade distinct from all other described species, with 100 % bootstrap support, and nucleotide identity (NI) of the four concatenated genes with the closest species *R. etli* was 95.0 %. Average nucleotide-identity (ANI) values of the whole genome of CNPSo 668^T and the closest species, *R. etli*, was 92.9 %. In the analyses of the symbiotic genes *nifH* and *nodC*, the strains comprised a cluster with other rhizobial symbionts of *P. vulgaris*. Other phenotypic and genotypic traits were determined for the new group and our data support the description of the three CNPSo strains as a novel species, for which the name *Rhizobium esperanzae* is proposed. The type strain is CNPSo 668^T (=UMR 1320^T =Z87-8^T =LMG 30030^T =U 10001^T), isolated from a common-bean nodule in Mexico.

Keywords: Biological nitrogen fixation; phylogeny of prokaryotes; ANI; MLSA; NI.

Legumes provide protein, minerals, vitamins and carbohydrates for human and animal nutrition [1]. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important grain legume for human consumption, in particular for low-income families in Latin America, the Caribbean and East Africa [2]. An important feature of common bean is its capacity for symbiotic

association, establishing N₂-fixing root nodules with a broad range of rhizobial species [3-9]. Amazingly, there are now reports of symbioses of common bean with at least 24 species of alpha- and beta-rhizobia, in addition to several putative new species.

The Mesoamerican and Andean regions have been recognized as the locations of the major ecogeographical gene pools of *P. vulgaris* [10], although recent molecular analysis has shown that Mesoamerica is the main center of origin of the legume [11]. Studies of the co-evolution of the legumes and rhizobia are important to achieve a better understanding of the symbiosis [12, 13]. Particularly interesting are the studies of co-evolution of promiscuous symbioses such as those involving common bean [14, 15]. *R. etli*-related strains represent the dominant species in common bean root nodules in the centers of diversification/domestication of this legume in Mexico [4, 16, 17], and in northwest Argentina [14, 15]. However, other rhizobia-related lineages might be important in Mesoamerica [9, 18], and new species symbionts of common bean from Mexico have been described recently, such as *R. hidalgonense* (although nodulation in the host legume is yet to be confirmed) [19] *R. acidisoli* [20] and *R. azibense*, which includes strains from Spain and Tunisia [21]. Interestingly, a probable additional third gene pool of *P. vulgaris* is localized between Peru and Ecuador [22], and a group of strains from this region comprises the species *R. ecuadorensis* [8]. Other putative new lineages from common bean gene pools, all fitting into the *R. phaseoli/R. etli/R. leguminosarum* clade, remain to be described [9].

Here we describe polyphasic analyses performed with one lineage identified as PEL-3 in our previous study [9], for which we propose the new species *Rhizobium esperanzae* sp. nov. The strains used in our study are listed in Table S1. The three strains used to define the new species—CNPSo 661, 666 and 668^T—were collected and isolated by Dr. Peter H. Graham (University of Minnesota) from *P. vulgaris* nodules of plants grown in Mexican soils and preliminary analyses with those strains have been performed by Ribeiro *et al.* [9]. The strains

are deposited at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture of Embrapa Soja (WFCC Collection # 1213, WDCC Collection # 1054), located in Londrina, State of Paraná, Brazil, and the type strain is available in other culture collections. The strains were grown on modified-yeast extract-mannitol agar (YMA) medium [23] at 28°C, unless otherwise indicated. Stock cultures were maintained on modified-YMA at 4°C, while long-term preservation was performed in modified-YM with 30 % glycerol at –80 °C and –150 °C, or by lyophilization.

In a previous analysis of the 16S rRNA gene, the three strains were clustered in a distinct group (PEL3 lineage) in the *R. phaseoli/R. etli/R. leguminosarum* clade [9]. An extended analysis of the 16S RNA genes, including newly described rhizobial species, was performed using maximum likelihood (ML) [24] in MEGA v.7 [25], and the Tamura-Nei model [26], and multiple-sequence alignments were constructed with MUSCLE [27]. Tree-node support was evaluated with bootstrap analysis [28] using 1,000 pseudoreplicates. A phylogenetic tree with the 16S rRNA gene was built with *Rhizobium* species, and Fig 1 shows the results obtained when the analysis was performed with closest and representative species; accession numbers are shown in the phylogram. The phylogram of the 16S rRNA confirmed the results of several reports [8, 29, 30], that the 16S rRNA gene sequence is unable to clearly delineate species phylogenetic positions, indicating that housekeeping genes should be analyzed. The 16S rRNA gene sequence analysis indicated higher similarity of the three strains with *R. fabae* and *R. ecuadorensis* (Fig. 1).

Four housekeeping genes were analyzed—*glnII*, *gyrB*, *rpoA* and *recA*—using the same parameters as defined for the 16S rRNA gene, and accession numbers are indicated in the phylograms obtained for each gene, in Figs. S1 to S4, respectively. When analyzed individually, CNPSo 661 and 668^T showed full congruence of the genealogies of the *glnII*, *gyrB* and *rpoA* genes, and were clustered with CNPSo 666 with high bootstrap support, of

95–98 % (Figs. S1, S2, S3). The only exception was with the *recA* gene (Fig. S4), where CNPSo 661 and 668^T were congruent, but CNPSo 666 was positioned in a different cluster, indicating differences in the evolutionary history of this gene (Fig. S4). It is worth mentioning that Bontemps *et al.* [31] described several *R. etli*-like strains isolated from *Mimosa* spp. in Mexico which nodulate common bean, but when we compared their *recA* sequences, strains CNPSo 661 and 668^T occupied a different cluster with high bootstrap support (data not shown), indicating that they should not belong to the same species. MLSA (Multilocus Sequence Analysis) has been increasingly used with success to define rhizobial species [*e.g.* 6-9, 19, 20, 32-34]. A phylogenetic tree was built with the concatenated partial sequences of *glnII*, *gyrB*, *rpoA* and *recA* genes, and the three strains from our study were clustered with high bootstrap support (99 %), being clearly distinct from the closest species, *R. etli* (Fig. 2). A phylogenetic tree was also built with two housekeeping genes, *glnII* and *gyrB*, as more sequences of *Rhizobium* strains were available for these two genes. Again, the three strains from our study were clustered (98 % of bootstrap support) and distinct from *R. etli* (Fig. S5). Nucleotide identities (NI) of the 16S rRNA and of the single and concatenated genes were calculated with BioEdit [35] and are shown in Table S2. Identity of the 16S rRNA gene between the *R. esperanzae* strains was 99.8 %, and for the housekeeping genes it ranged from 92.3 to 100 %. Considering the four concatenated genes, the similarity between CNPSo 668^T and CNPSo 661 was 99.6 % and with CNPSo 666 it was 97.4 %, within the range of the same species. Konstantinidis *et al.* [36] found that 96 % of identity in concatenated housekeeping genes is equivalent to 70 % DNA-DNA hybridization (DDH). Considering the strain CNPSo 668^T with the closest species *R. etli* CFN 42^T, the similarity of the 16S rRNA gene was 99.4 %, for three housekeeping genes 94.2 %, and for four housekeeping genes 95.0 %. According to the proposals of threshold for species definition [37-39], the NI values obtained from the MLSA indicate that the group of CNPSo strains represents a new species.

Values of average nucleotide identity (ANI) of whole genomes between 95.0 % and 96.5 % are equivalent to the 70 % DDH threshold [36, 39-43], and useful for describing rhizobial species [e.g. 8, 19, 33, 34, 44]. A draft of the whole genome sequence of CNPSo 668^T was obtained and deposited at the DDBJ/ENA/GenBank (Accession Number MXP000000000). ANI values were obtained using the JSpecies program [41] and nd MUMmer v. 3.0 [45] for sequence alignment. Genome sequences of the closest type strain *R. etli* CFN 42^T was retrieved from GenBank (CP000133.1, chromosome) and the ANI value between them was estimated as 92.9 %, another indication of a new species.

To determine the DNA G+C content of CNPSo 668^T, genome contigs were concatenated and the proportion of G+C bases was calculated with JSpecies [41]. G+C content of strain CNPSo 668^T was 59.8 mol%, which is in the range of *Rhizobium* and of the close species *R. etli* CFN 42^T (60.5 mol%) and *R. ecuadorensis* CNPSo 671^T (61.1 mol%).

Fingerprint DNA analysis was performed by BOX-PCR, as described by Kaschuk *et al.* [46]. The profiles were compared with eight reference strains. The clusters were generated using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) algorithm [47] and the Jaccard coefficient [48], with 2 % tolerance, using the Bionumerics program (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6). The three CNPSo strains were clustered with 85 % similarity, differing from all other reference strains (Fig. S6).

The fatty-acid profile of strain CNPSo 668^T was determined using the MIDI Sherlock microbial identification system with the TSBA6 database, after growth for five days on YMA, and the results and methodology details are shown in Table S3. Strain CNPSo 668^T contained summed feature 8 (C_{18:1 w7c}/C_{18:1 w6c}, 50.2 %), C_{19:0 cyclo w8c} (28.2 %), C_{18:0} (6.5 %) and summed feature 2 (C_{14:0 3OH}/C_{16:1 iso I}, 6.2%) as major components, values normally found in members of the genus *Rhizobium* [49].

Although symbiotic characteristics are not mandatory for species differentiation, as the main feature of CNPSo strains is their ability to form nitrogen-fixing nodules in common bean, we investigated the phylogeny of nodulation (*nodC*) and nitrogen-fixation (*nifH*) genes. Primers and amplification conditions were performed as described by Laguerre *et al.* [50] and accession numbers obtained are shown in the phylograms. In the phylogenetic tree with *nodC* genes, the three CNPSo strains were similar and clustered with *R. sophorae* CCBAU 03386^T (Fig. 3). Interestingly, all strains clustered closer to the CNPSo strains were symbionts of *P. vulgaris* originating from sites in China, Tunisia, Ecuador and Mexico.

The phylogeny of *nifH* has also shown a correlation with the host plant, with a major cluster including species/strain symbionts of *P. vulgaris*, such as *R. acidisoli* FH23, *R. hidalgonense* FH14^T, *R. phaseoli* ATCC14482^T, *R. etli* CFN42^T and *R. ecuadorensis* CNPSo 671^T (Fig. S7). To confirm the symbiotic ability of the CNPSo strains, a nodulation test was carried out. Seeds of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* were surface-sterilized, germinated, inoculated with each strain and grown in previously sterilized substrate, under greenhouse conditions and receiving N-free nutrient solution. Effective N₂-fixing nodules, characterized by internal pink color due to the leghemoglobin and green leaves, were observed after 25 days only on common bean.

The phenotypic and physiological features of the novel isolates were determined and compared with those of type strains of the closest species. Unless indicated, phenotypic tests were performed at 28 °C, evaluating colony morphology, tolerance of NaCl, acid/alkali reaction in YMA medium with bromothymol blue, temperature and pH, and growth in liquid Luria-Bertani (LB) medium, as previously described by Hungria *et al.* [51]. Enzymatic degradation of urea was determined in YMA medium containing 2 % urea and phenol red as an indicator. Contrary to major tropical symbionts of common bean, *R. tropici* and *R. leucaenae*, and similar to the major Mesoamerican symbiont *R. etli*, strains CNPSo 661, 666

and 668^T did not grow in acid conditions (pH 4.0), high temperature (37 °C), or tolerate 1 % NaCl (Table 1).

Tolerance of antibiotics was evaluated using the disc-diffusion method on YMA plates with the following antibiotics (per disc): ampicillin (10 µg), bacitracin (0.04 U), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), nalidixic acid (30 µg), neomycin (30 µg), penicillin (10 U), streptomycin (10 µg) and tetracycline (30 µg). All tests were performed in triplicate. The CNPSo strains were sensitive to ampicillin, cefuroxime, streptomycin and tetracycline and were tolerant or moderately tolerant of the other antibiotics (Table 1). When compared to *R. etli* CFN 42^T, the closest species, the CNPSo strains were sensitive to ampicillin, cefuroxime and streptomycin.

Utilization of different carbon sources was determined using the API 50CH kit (BioMérieux), following the manufacturer's recommendations, using YM-minus-mannitol as the basal medium. All tests were performed in triplicate. Strains CNPSo 661, 666 and 668^T showed abundant growth with esculin, amidon (starch), glycogen and D-turanose, in contrast to the closest type strain *R. etli* CNF 42^T, that showed absence of, or weak growth. As usual in *Rhizobium*, the CNPSo strains showed abundant growth in glycerol, D- and L-arabinose, D- and L-fucose and D-arabitol.

In conclusion, based on the extensive polyphasic data related to phenotypic, genotypic and phylogenetic analyses, the results indicate that strains CNPSo 661, 666 and 668^T represent a novel species of *Rhizobium*, for which the name *Rhizobium esperanzae* sp. nov. is proposed, with SEMIA 668^T nominated as the type strain.

Description of *Rhizobium esperanzae* sp. nov.

Rhizobium esperanzae: es.pe.ran'zae. N.L. fem. gen. n. *esperanzae*, of Esperanza, named after Dr. Esperanza Martínez-Romero, scientist of the Center of Genomic Sciences,

Cuernavaca, Mexico, who dedicates her life to studies of diversity of rhizobia, with an emphasis on symbionts of common bean.

Cells are Gram-stain negative, aerobic, non-spore-forming rods. Colonies on YMA medium are circular, opaque, with abundant production of mucus and usually 1-2 mm in diameter with 2-3 days of incubation at 28 °C. Strains acidify YMA medium after 3 days and do not grow on LB medium, YMA medium at 37 or 40 °C, YMA with pH 4.0 or YMA with 1 % NaCl. They grow in PY medium lacking calcium and are positive for urease activity. Strains are tolerant of bacitracin (0.04 U), but not to ampicillin (10 µg), cefuroxime (30 µg), streptomycin (10 µg) and tetracycline (30 µg). With respect to carbon sources in the API test, strains are positive for amidon (starch), D-arabinose, L-arabinose, D-arabitol, esculin, D-fucose, L-fucose, glycerol, glycogen, D-turanose. Strains metabolize weakly D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, βD- xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-rhamose, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl- α-D-glucoside, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose, –gentibiose, D-lyxose, and do not use erythritol, L-sorbose, dulcitol, α-methyl-D-mannoside, amygdalin, arbutin, salicin, inulin, D-melezitose, xylitol, D-tagatose, L-arabitol, potassium gluconate, potassium 2-keto-gluconate and potassium 5-keto-gluconate. Strains form effective nitrogen-fixing nodules in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

The type strain is CNPSo 668^T (=UMR 1320^T =Z87-8^T =LMG 30030^T =U 10001^T), isolated from N₂-fixing effective nodules of *Phaseolus vulgaris* L. in Mexico. The DNA G+C content of the type strain is 59.8 mol%.

Funding information

Partially financed by INCT- Plant-Growth Promoting Microorganisms for Agricultural Sustainability and Environmental Responsibility- (CNPq 465133/2014-2, Fundação Araucária) and Embrapa (02.13.08.001.00.00). A.B. Cordeiro and L.C.R. Helene acknowledge MSc and PhD fellowships, respectively, from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Acknowledgments

Authors acknowledge Dr. Itamar S. Melo and Marcia Parma (Embrapa Meio Ambiente) for help with the fatty acids analyses, Ligia Maria O. Chueire, Rebeca F. Dall’Agnol and Jakeline R.M. Delamuta (Embrapa Soja) for help in several steps of this work, and Dr. Allan R.J. Eaglesham for English suggestions. We are grateful to Dr. Peter Graham (*in memoriam*), who isolated the strains.

Conflicts of Interest and Ethical Statement

Authors declare no conflicts of interest or ethical problems.

References

1. **Prodanov M, Sierra I, Vidal-Valverde C.** Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. *Food Chem* 2004;84:271-277.
2. **CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research).** (2012). Common bean. Available at: <http://www.cgiar.org/our-strategy/crop-factsheets/beans/>. Access: 03/08/2017.
3. **Herrera-Cervera JA, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N et al.** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecol* 1999;30:87-97.
4. **Martínez-Romero E.** Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 2003;252:11-23.
5. **Aserse AA, Rasanen LA, Assefa F, Hailemariam A, Lindström K.** Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:120-131.
6. **Dall'Agnol RF, Ribeiro RA, Delamuta JRM, Ormeno-Orrillo E, Rogel MA et al.** *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:3222-3229.
7. **Dall'Agnol RF, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Rogel MA, Delamuta JR et al.** *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:4167-4173.
8. **Ribeiro RA, Martins TB, Ormeño-Orrillo E, Delamuta JRM, Rogel MA et al.** *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:3162-3169.
9. **Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Dall'Agnol RF, Graham PH, Martínez-Romero et al.** Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Res Microbiol* 2013;164:740-748.
10. **Gepts P, Debouck D.** Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: van Schoonhoven A, Voysest O (editors). *Common Beans, Research for Crop Improvement*. Wallingford: CAB; 1991. pp. 7-53.

11. Bitocchi E, Nanni L, Bellucci E, Rossi M, Giardini A *et al.* Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:788-796.
12. Martínez-Romero E. Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol* 2009;28:361-37.
13. Sprent JI, Ardley J, James EK. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol* 2017;174:11-25.
14. Aguilar OM, López MV, Riccillo PM, Gonzalez, RA, Pagano, M *et al.* Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rDNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3250-3524.
15. Aguilar OM, Riva O, Peltzer E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13548-13553.
16. Segovia L, Young J, Martínez-Romero E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* sv. phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 1993;43:374-37.
17. Souza V, Bain J, Silva C, Bouchet V, Valera A *et al.* Ethnomicrobiology: Do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*? *J Ethnobiol* 1997;17:249–266.
18. López-Guerrero MG, Ormeño-Orrillo E, Velázquez E, Rogel MA, Acosta JL. *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:353-358.
19. Yan J, Yan H, Liu LX, Chen WF, Zhang XX *et al.* *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Arch Microbiol* 2017;199:97-104.
20. Román-Ponce B, Zhang YJ, Vásquez-Murrieta MS, Sui XH, Chen WF *et al.* *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:398-406.
21. Mnasri B, Liu TY, Saidi S, Chen WF, Chen WX *et al.* *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:1501-1506.

22. **Debouck DG, Toro O, Paredes M, Johnson WC, Gepts P.** Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabacea) in northwestern South America. *Econ Bot* 1993;47:408-423.
23. **Hungria M, O'Hara GW, Zilli JE, Araujo RS, Deaker R, Howieson JG.** Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson JG, Dilworth JG (editors). *Working with Rhizobia* Canberra, Australia: ACIAR; 2016. pp. 39-60.
24. **Felsenstein J.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981;17:368-376.
25. **Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-1879.
26. **Tamura K, Nei M.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;10:512-526.
27. **Edgar RC.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792-1797.
28. **Felsenstein J.** Confidence-limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783-791.
29. **Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P et al.** Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1043-1047.
30. **Berrada H, Fikri-Benbrahim K.** Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *Br Microbiol Res J* 2014;4:616-639.
31. **Bontemps C, Rogel MA, Wiechmann A, Mussabekova A, Moody S et al.** Endemic Mimosa species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol* 2016;209(1):319-33.
32. **Jiao YS, Yan H, Ji ZJ, Liu YH, Sui XH et al.** *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:497-503.
33. **Delamuta JRM, Ribeiro RA, Araújo JLS, Rows LFM, Zilli JE et al.** *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:3078-3087.
34. **Helene LCF, Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Rogel MA et al.** *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;65:4441-4448.

35. **Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95-98.
36. **Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM.** Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:7286-7293.
37. **Stackebrandt E, Ebers J.** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006;33:152-155.
38. **Durán D, Rey L, Mayo J, Zúñiga-Dávila D, Imperial J et al.** *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:2072-2078.
39. **Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J.** Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:346-351.
40. **Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P et al.** DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:81-91.
41. **Richter M, Rosselló-Móra R.** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19126-19131.
42. **Ormeño-Orillo E, Servín-Garcidueñas LE, Rogel MA, González V, Peralta H et al.** Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Syst Appl Microbiol* 2015;38:287-291.
43. **Varghese NJ, Mukherjee S, Ivanova N, Konstantinidis KT, Mavrommatis K, Kyrpides NC, Pati A.** Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Res* 2015;43:6761-6771.
44. **Rashid MH, Young JPW, Everall I, Clercx P, Willems A et al.** Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:3037-3045.
45. **Kurtz S, Phyllippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M et al.** Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 2004;5:R12.
46. **Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS, Campo RJ.** Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol* 2006;32:210-220.

- 47. Sneath PHA, Sokal RR.** Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, USA: W. H. Freeman and Company; 1973. 573 p.
- 48. Jaccard P. (1912).** The distribution of flora in the alpine zone. *New Phytol* 1912;11: 37-50.
- 49. Tighe SW, Lajudie P, Dipietro K, Lindström K, Nick G et al.** Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:787-801.
- 50. Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan S, Drouin P et al.** Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 2001;147:981-993.
- 51. Hungria M, Chueire LMO, Coca RG, Megías M.** Preliminary characterization of fast growing strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol Biochem* 2001;33:1349-1361.

Figure Legends

Figure 1. Maximum likelihood phylogeny based on the 16S rRNA gene sequences (1,227 bp) of *Rhizobium*. Accession numbers are indicated in parentheses. Strains of the novel species are shown in bold. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T was used as outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

Figure 2. Maximum likelihood phylogeny based on the concatenated gene sequences of *glnII* (444 bp), *gyrB* (577 bp), *rpoA* (415 bp) and *recA* (343 bp), showing the relationships between strains of the novel species (in bold) and other members of the *Rhizobium* genus. Accession numbers are indicated in parentheses. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T was used as outgroup. Bar indicates five substitutions per 100 nucleotide positions.

Figure 3. Maximum likelihood phylogram based on *nodC* (501 bp) gene sequences. Accession numbers are indicated in parentheses. *R. esperanzae* strains are shown in bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. Bar indicates five substitutions per 100 nucleotide positions.

Table 1. Phenotypic features of *R. esperanzae* strains and related *Rhizobium* species. 1. *R. tropici* CIAT 899^T; 2. *R. leucaenae* CFN 299^T; 3. *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370^T; 4. *R. ecuadorensis* CNPSo 671^T; 5. *R. phaseoli* ATCC 14482^T; 6. *R. pisi* DSM 30132^T; 7. *R. fabae* CCBAU 33202^T; 8. *R. etli* CFN 42^T; 9. *R. esperanzae* CNPSo 661; 10. *R. esperanzae* CNPSo 666; 11. *R. esperanzae* CNPSo 668^T.

Data represent the means of three biological replicates. +, Growth; -, no growth; w, weakly positive. ND (not determined).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Growth on/at/with											
pH 4.0	+	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LB	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40 °C	+	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 1 %	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Urea 2 %	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PY minus Calcium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibiotic Tolerance (per disc)											
Ampicillin (10 µg)	+	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-
Bacitracin (0.04 U)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cefuroxime (30 µg)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chloramphenicol (30 µg)	+	-	w	-	-	-	+	-	-	w	w
Erythromycin (15 µg)	w	+	-	+	-	-	-	w	w	-	w
Nalidic acid (30 µg)	+	+	+	-	w	+	+	-	w	+	+
Neomycin (30 µg)	w	-	-	-	w	+	w	-	w	w	w
Penicillin (10 U)	+	+	+	+	w	+	+	+	w	+	+
Streptomycin (10 µg)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Tetracycline (30 µg)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbohydrate source											
Glycerol	+	+	w	+	+	+	w	+	+	+	+
Erythritol	+	-	-	-	-	w	w	+	-	-	-
D-Arabinose	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w
D-Xylose	+	+	w	+	w	w	w	+	w	w	w
L-Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+	w	w	w
D-Adonitol	+	+	w	-	w	w	w	w	w	w	w
Metyl-βD-xylopyranoside	+	+	w	w	w	w	w	w	w	w	w
D-Galactose	N/D	N/D	w	+	w	w	+	w	w	+	w
D-Glucose	+	+	w	w	w	w	+	w	w	+	w
D-Fructose	+	+	w	w	w	w	+	+	w	+	w
D-Mannose	+	+	w	w	w	w	+	+	w	+	w
L-Sorbose	N/D	N/D	w	-	-	w	w	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	w	+	w	+	+	w	w	+	w
Dulcitol	-	w	w	-	-	w	w	w	-	w	-
Inositol	+	+	w	w	+	w	+	+	w	w	w
D-Mannitol	+	+	w	w	w	w	+	w	w	w	w

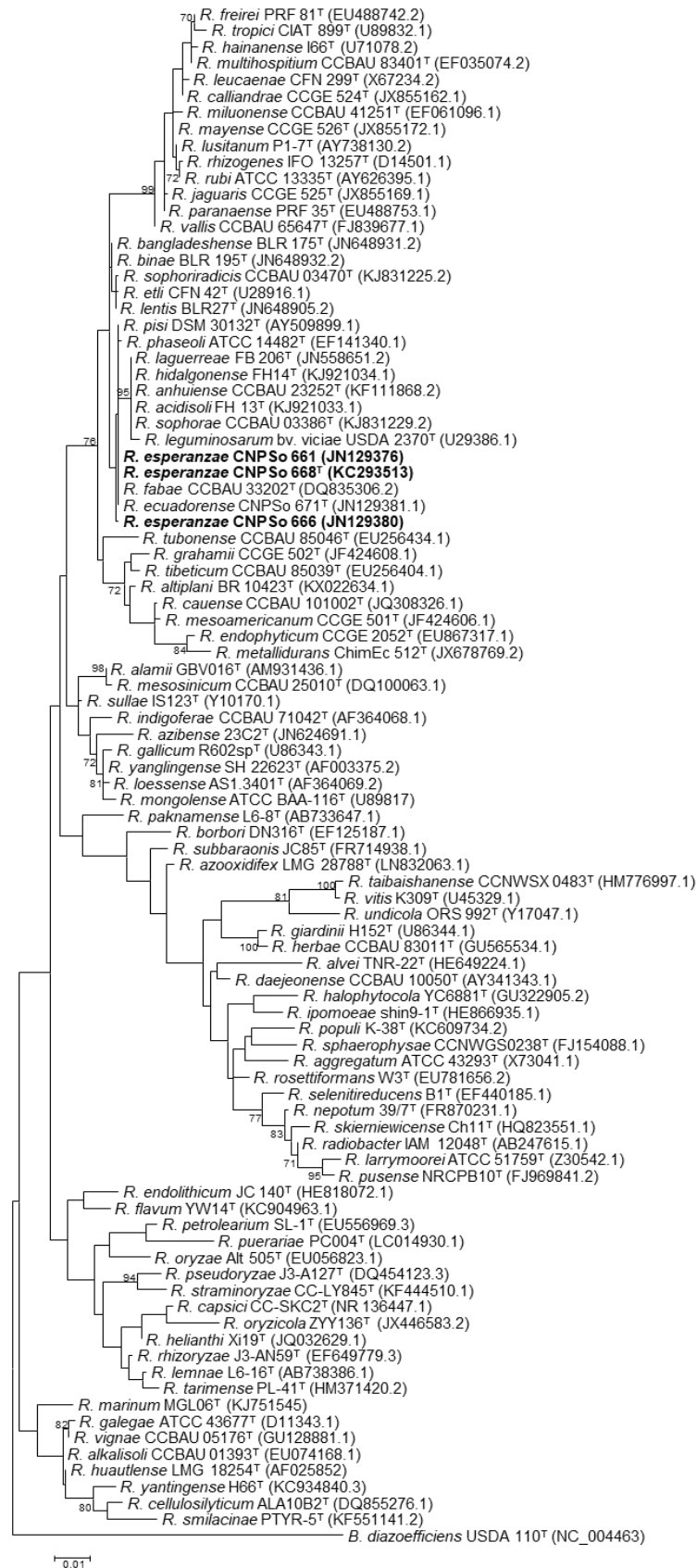


Fig. 1.

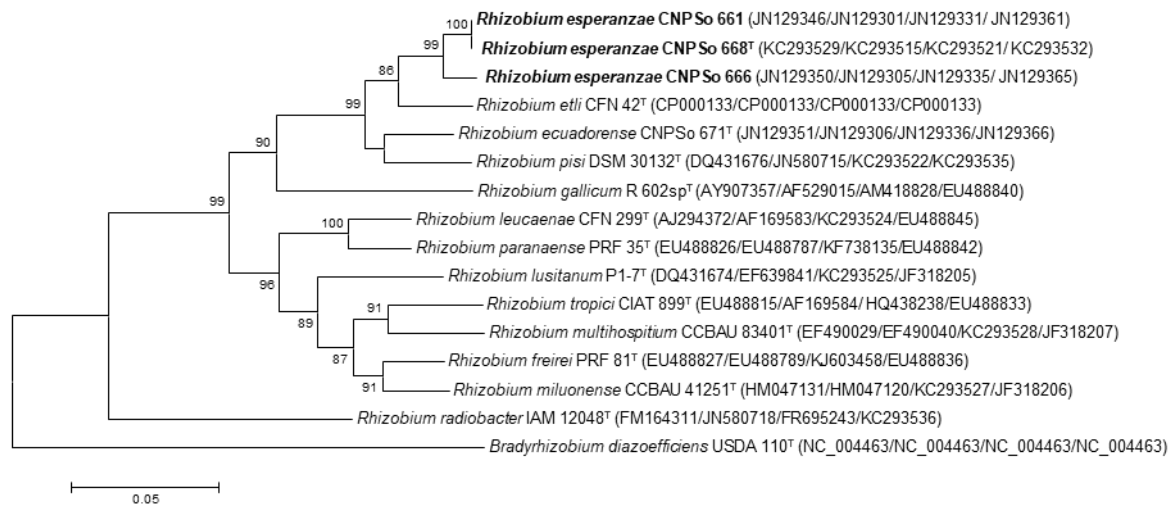


Fig. 2.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

***Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils**

Andrey Barbosa Cordeiro, Renan Augusto Ribeiro, Luisa Caroline Ferraz Helene, Mariangela Hungria

Corresponding author: Mariangela Hungria, Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, Brazil. E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br; biotecnologia.solo@hotmail.com

Table S1. Strains used in this study.

Species/strain name	Other strain nomenclature	Original host plant	Geographical origin	Supplied by
<i>R. esperanzae</i> CNPSo 661	UMR 1286, Z31-4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico	University of Minnesota, USA
<i>R. esperanzae</i> CNPSo 666	UMR 1317, Z95B-8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico	University of Minnesota, USA
<i>R. esperanzae</i> CNPSo 668 ^T	UMR 1320 ^T , Z87-8 ^T , U10001 ^T , LMG30030 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico	University of Minnesota, USA
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 ^T	CNPSo 140 ^T , USDA 9032 ^T , ATCC 51251 ^T , DSM 11541 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico	Centro de Ciencias Genómicas (CCG), Mexico
<i>Rhizobium ecuadorensis</i> CNPSo 671 ^T	UMR 1450 ^T , PIMAMPIRS I 5 ^T , LMG 27578 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pimampiro/Imbaburra/Ecuador	University of Minnesota, USA
<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	CNPSo 2057 ^T , 316c15 ^T , DSM 30137 ^T , IAM 12612 ^T , LMG 8819 ^T , 316c15 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Without information	CCG, Mexico
<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	CNPSo 2059 ^T , LMG 23997 ^T	<i>Vicia faba</i>	Nanchang, Jiangxi, China	CCG, Mexico
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	CNPSo 2058 ^T , NCIMB 11478 ^T	<i>Pisum sativum</i>	Rochelle, Illinois, USA	CCG, Mexico
<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	CNPSo 134 ^T , 3HOq18 ^T , ATCC 10004 ^T , LMG 11200 ^T , NCIMB 11478 ^T , SEMIA 320 ^T , ATCC 10004 ^T	<i>Pisum sativum</i>	Rochelle, Illinois, USA	USDA, Beltsville, USA
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	CNPSo 142 ^T , ATCC 49672 ^T , DSM 11418 ^T , HAMB I 1163 ^T , NBRC 15247 ^T , JCM 21072 ^T , LMG 9503 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia	CCG, Mexico
<i>R. leucaenae</i> CFN 299 ^T	CNPSo 141 ^T , CENA 183 ^T , CECT 4844 ^T , IAM 14230 ^T , JCM 21088 ^T , LMG 951 ^T , SEMIA 4083 ^T , UMR1026 ^T , USDA 9039 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	CCG, Mexico

Table S2. Range of nucleotide identity (NI, %) between *Rhizobium esperanzae* strains and closest *Rhizobium* species in the 16S rRNA and protein-coding genes. Length of aligned regions: 16S rRNA (1,227 pb), *recA* (343 bp), *glnII* (444 bp), *gyrB* (577 bp) and *rpoA* (415 bp) (N/A, not available; N/D, not determined).

	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoA</i>	Concatenated 2 genes *	Concatenated 3 genes **	Concatenated 4 genes ***
within <i>R. esperanzae</i> CNPSo 668^T and								
CNPSo 661	99.8	100	100	100	98.5	100	100	99.6
CNPSo 666	99.8	92.3	100	98.7	97.5	96.4	97.4	97.4
between <i>R. esperanzae</i> CNPSo 668^T and								
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 ^T	99.4	92.3	97.2	93.0	97.5	95.1	94.2	95.0
<i>Rhizobium acidisoli</i> FH13 ^T	99.6	92.9	95.4	N/A	N/A	94.4	N/D	N/D
<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 ^T	99.6	93.2	93.9	92.7	N/A	93.6	93.2	N/D
<i>Rhizobium azibense</i> 23C2 ^T	97.4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/D	N/D	N/D
<i>Rhizobium bangladeshense</i> BLR175 ^T	99.6	90.6	94.3	N/A	N/A	92.7	N/D	N/D
<i>Rhizobium binae</i> BLR195 ^T	99.6	94.4	95.9	N/A	N/A	95.2	N/D	N/D
<i>Rhizobium ecuadorensis</i> CNPSo 671 ^T	99.7	90.9	95.9	92.7	97.3	93.7	93.3	94.2
<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	100	92.3	95.0	92.0	N/A	93.8	93.1	N/D
“ <i>Rhizobium hidalgonense</i> ” FH14	99.6	90.0	94.5	94.8	N/A	92.6	93.5	N/D
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	99.6	90.3	93.9	N/A	N/A	92.3	N/D	N/D
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T	99.2	92.6	92.7	91.5	N/D	92.7	92.2	N/D
<i>Rhizobium leucaenae</i> LMG 9517 ^T	97.8	89.1	89.4	86.4	94.6	89.3	88.1	N/D
<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	99.9	95.6	92.7	92.5	N/A	94.0	93.3	N/D
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	100	91.8	94.1	91.8	98.5	93.1	92.5	93.9
<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	99.6	91.8	93.6	N/A	N/A	92.8	N/D	N/D
<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 ^T	99.6	95.9	95.0	N/A	N/A	95.4	N/D	N/D
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	97.1	85.6	90.0	85.4	95.1	87.9	87.0	88.9
<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647 ^T	98.1	91.8	93.4	N/A	N/A	92.7	N/D	N/D
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	89.4	81.5	86.2	69.1	82.2	84.2	77.8	78.8

Table S3. Fatty acid profile (%) of *Rhizobium esperanzae* CNPSO 668^T and related species grown for 7 days at 28 °C on YMA. Data obtained the with MIDI system using FAMA library TSBA6. Analyses performed in a GC Agilent model 6850 with an Ultra 2 column (25 m length, ID 0.2 mm, film f0.33 µm), detector FID, carrier gas hydrogen (30 mL/min), and make-up gas nitrogen (30 mL/min), automatic injector series 7683 (liner 19251-60540), injection of 2 µL, run of 25 min. Injector temperature of 250 °C and the detector of 300 °C. Program of the oven temperature: initial of 170 °C, raising 5 °C/min till 260 °C (hold for 18 m), then raised at 40 °C/min till 310 °C (hold for 1.5 min).

Strains: 1, *R. esperanzae* CNPSO 668^T; 2, *R. fabae* CCBAU 33202^T; 3, *R. phaseoli* ATCC 14482^T; 4, *R. etli* CFN 42^T; 5, *R. leguminosarum* USDA 2370^T; 6, *R. ecuadorensis* CNPSO 671^T; 7, *R. pisi* DSM 30132^T; 8, *R. leucaenae* CFN 299^T; 9, *R. tropici* CIAT 899^T.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C _{15:0} 2OH	0.5	1.3	1.0	0.4	0.7	-	1.6	-	-
C _{15:0} 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
C _{16:0}	2.8	3.1	2.9	3.8	3.6	8.6	3.6	8.5	5.4
C _{16:0} 3OH	1.4	0.9	1.2	1.6	1.6	-	1.2	-	4.4
C _{17:0}	1.1	-	-	-	1.3	-	1.1	-	0.6
C _{18:0}	6.5	9.0	9.8	7.0	3.2	8.1	6.8	-	3.7
C _{18:0} 3OH	2.2	2.1	3.0	1.6	2.6	-	1.8	-	2.3
C _{18:1} 2OH	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2
C _{18:1} w7c 11 methyl	0.5	0.5	1.1	-	4.4	3.2	10.5	-	1.0
C _{18:1} w9c	-	-	-	-	-	3.9	0.6	-	-
C _{19:0} cyclo w8c	28.2	7.0	13.8	10.2	15.6	18.4	21.1	26.5	30.1
C _{20:2} w6, 9c	0.4	-	-	-	-	-	-	-	0.7
Summed feature 2	6.2	5.1	4.8	4.9	6.5	-	6.0	-	-
Summed feature 8	50.2	69.7	61.2	68.7	38.5	-	45.2	-	-
Summed feature 3	-	0.6	-	0.6	0.8	-	0.4	-	-

Summed feature 2 = 12:0 aldehyde/unknown 10.928; summed feature 3 = 16:1w6c/16:1w7c; summed feature 8 = 18:1w7c/18:1w6c.

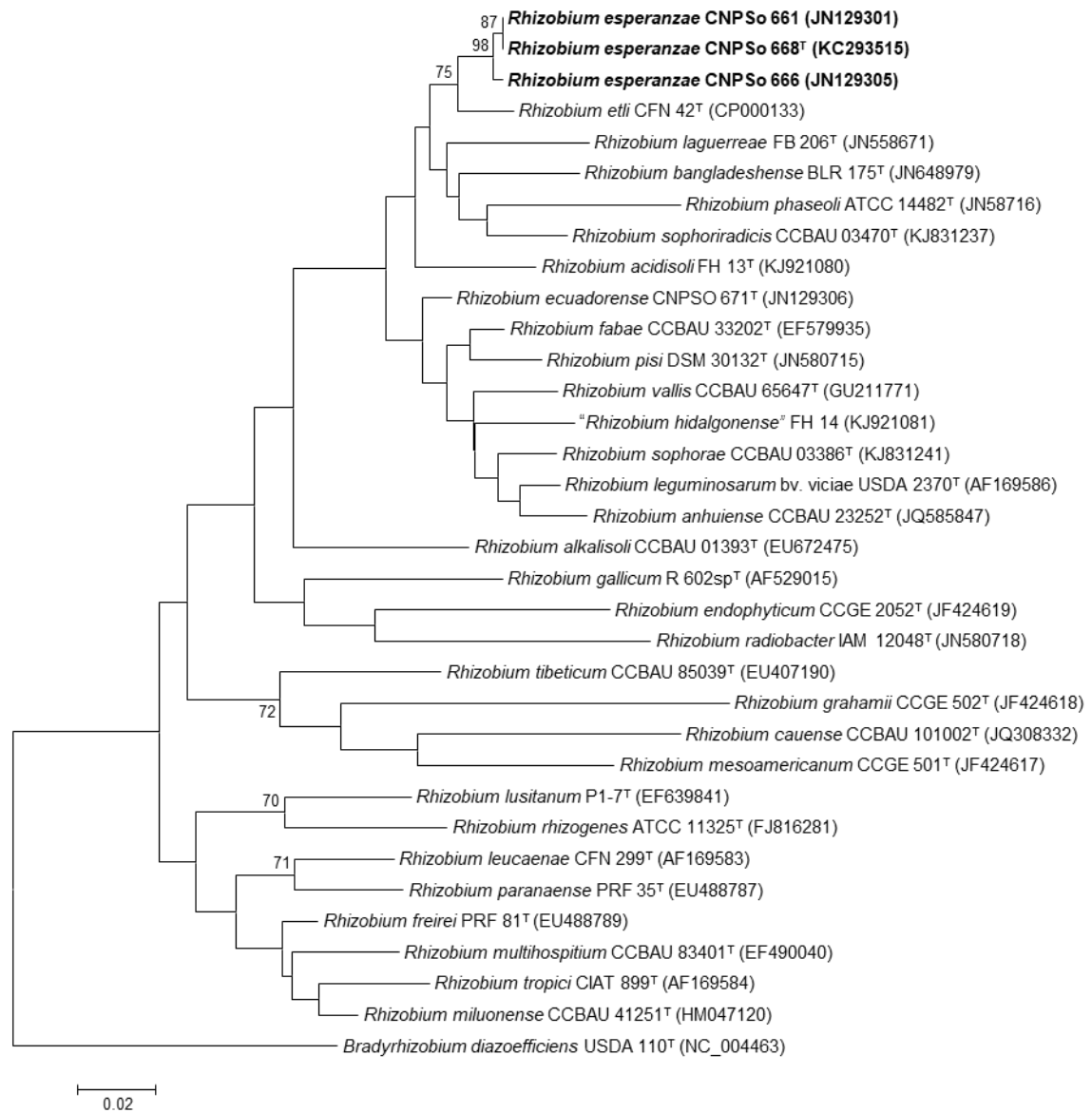


Fig. S1. Maximum likelihood phylogram based on *glnII* gene sequences (444 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. *Rhizobium esperanzae* strains from this study are shown in bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

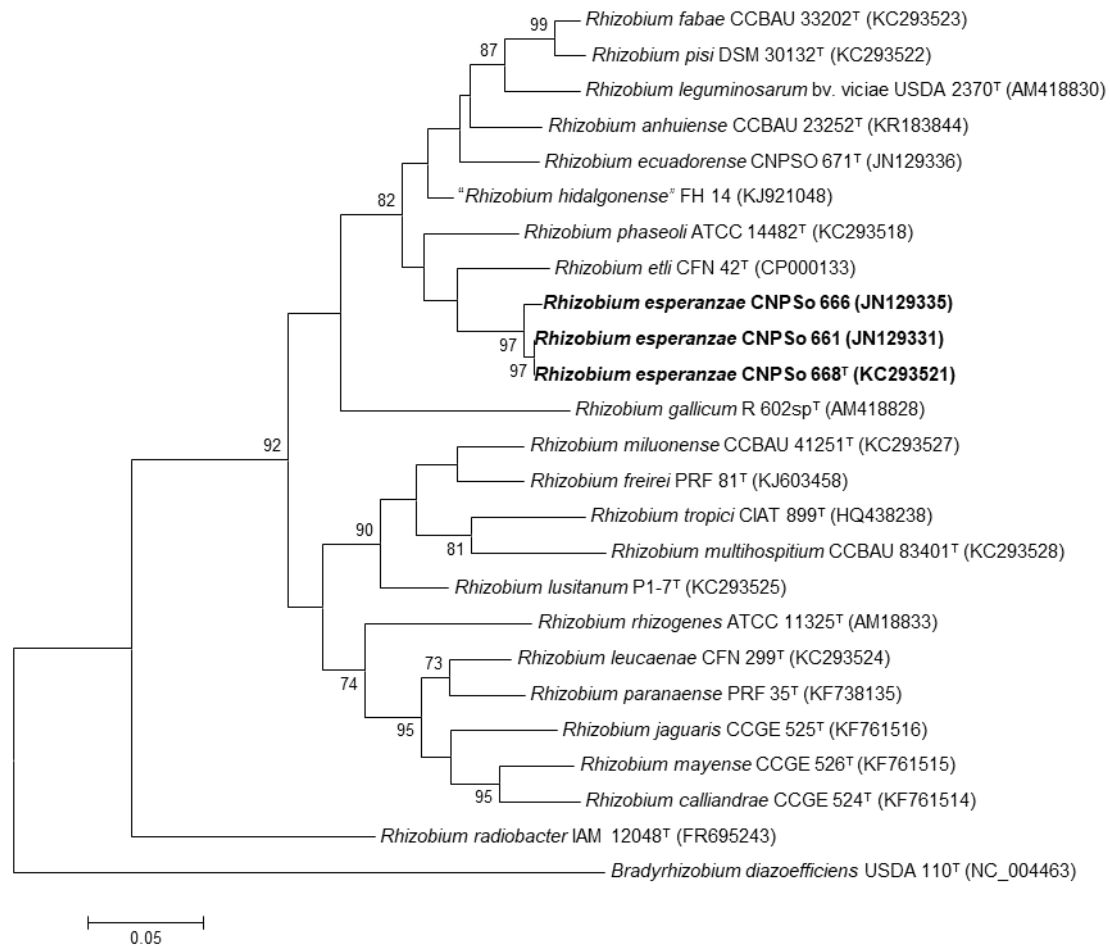


Fig. S2. Maximum likelihood phylogram based on *gyrB* gene sequences (577 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. *Rhizobium esperanzae* strains from this study are shown in bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T was used as outgroup. Bar indicates five substitutions per 100 nucleotide positions.

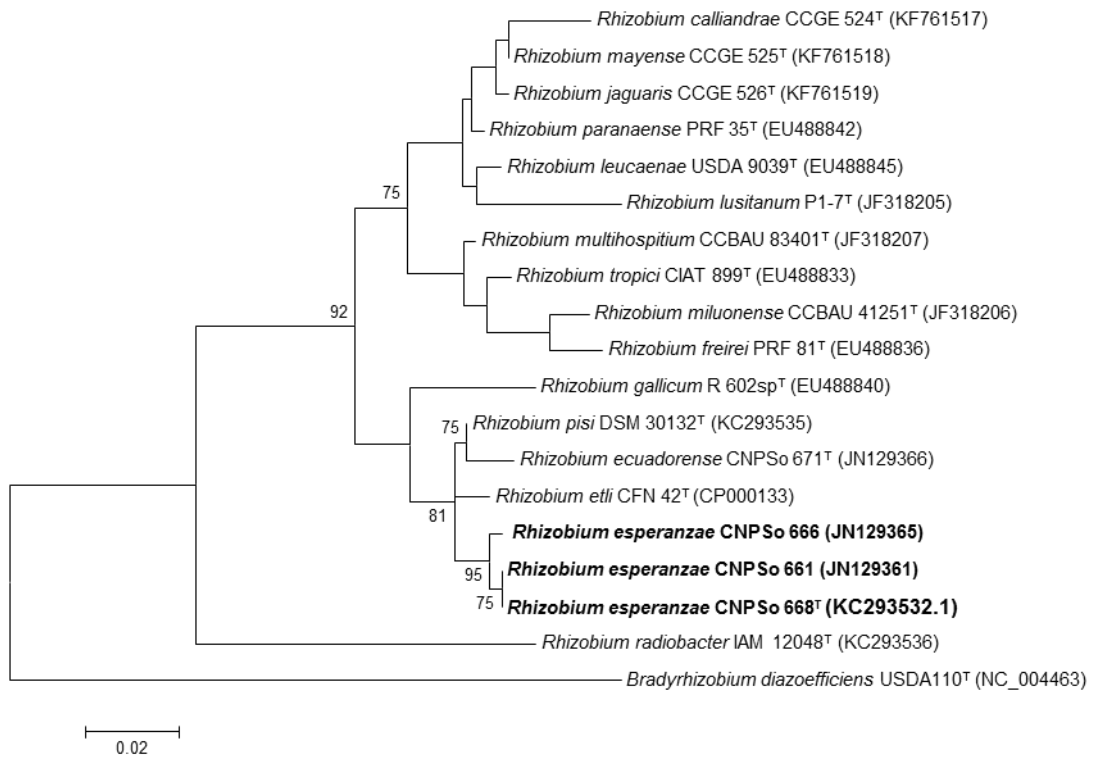


Fig. S3. Maximum likelihood phylogram based on *rpoA* gene sequences (415 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. *Rhizobium esperanzae* strains from this study are shown in bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

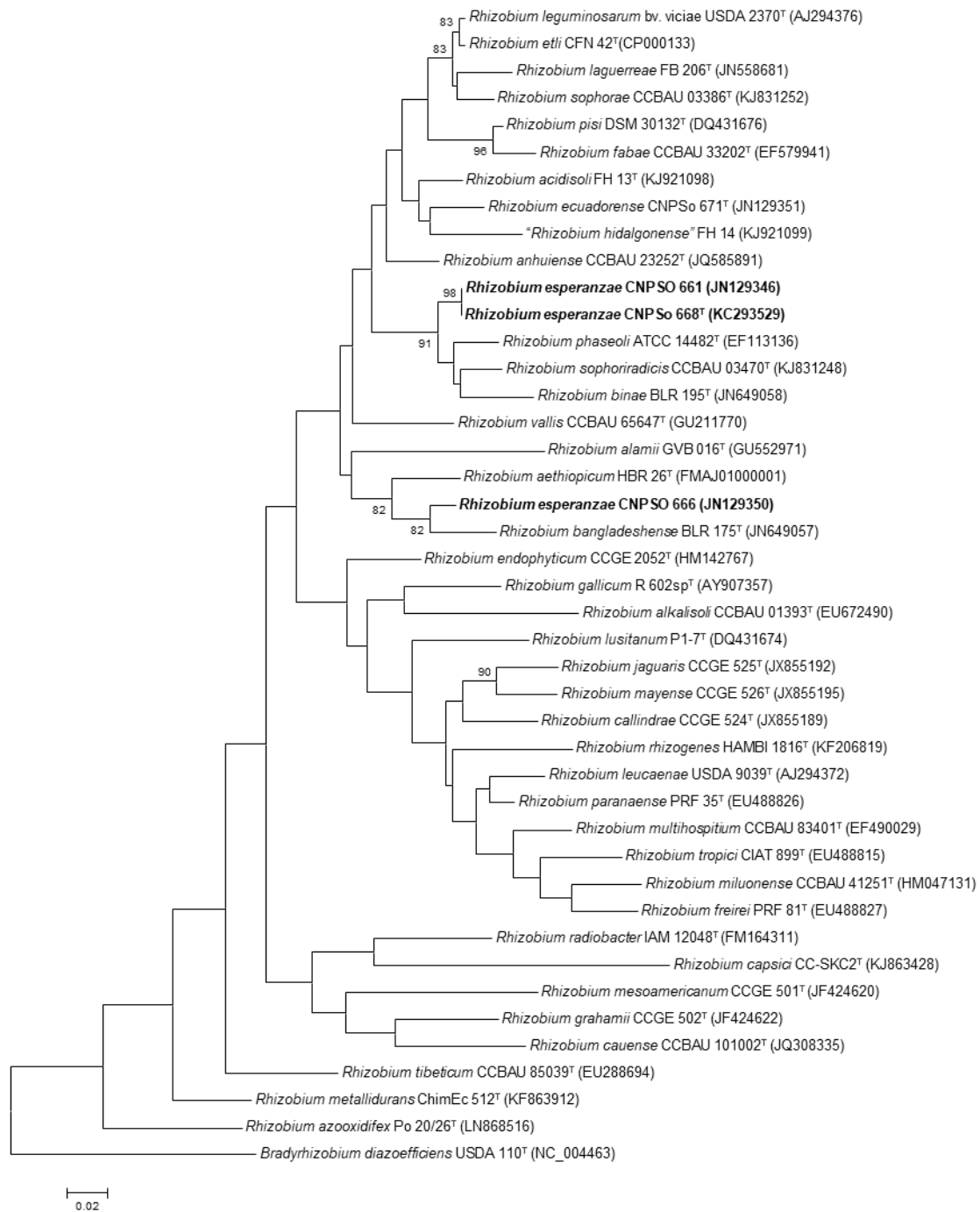


Fig. S4. Maximum likelihood phylogram based on *recA* gene sequences (343 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. *Rhizobium esperanzae* strains from this study are shown in bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

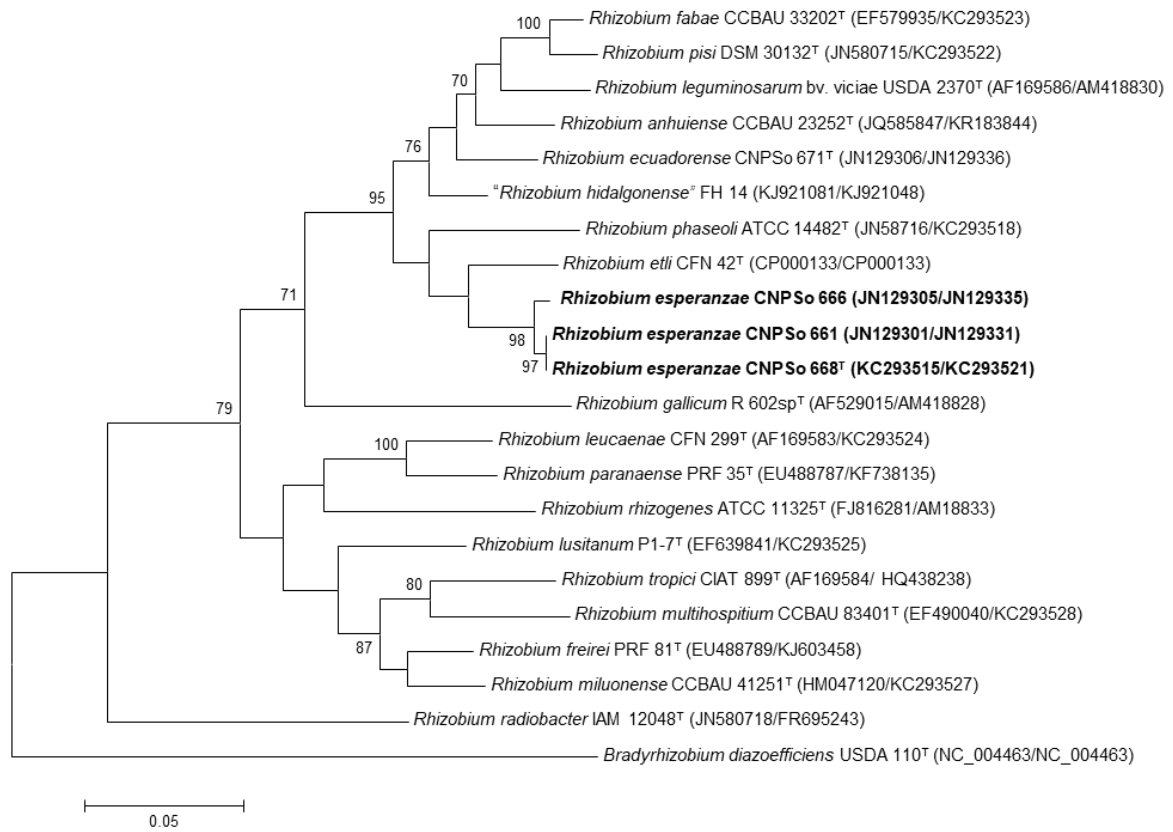


Fig. S5. Maximum likelihood phylogeny based on the concatenated *glnII* (444 bp) and *gyrB* (577 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. *Rhizobium esperanzae* strains from this study are shown in bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T was used as outgroup. Bar indicates five substitutions per 100 nucleotide positions.

Box

Box

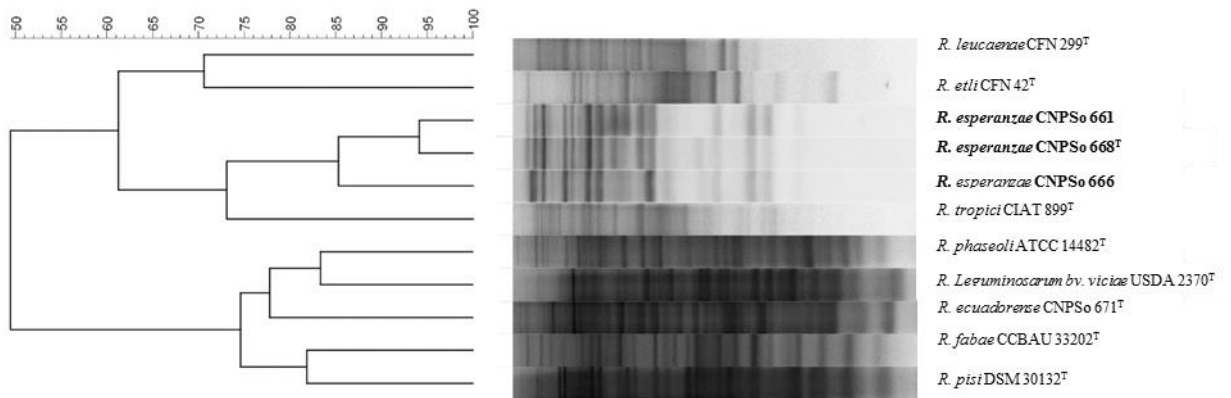


Fig. S6. Cluster analysis of products obtained by BOX- PCR of *Rhizobium esperanzae* strains (shown in bold) and closely related *Rhizobium* species. Analysis performed with the program Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6) using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) and the Jaccard coefficient, with 2 % tolerance.

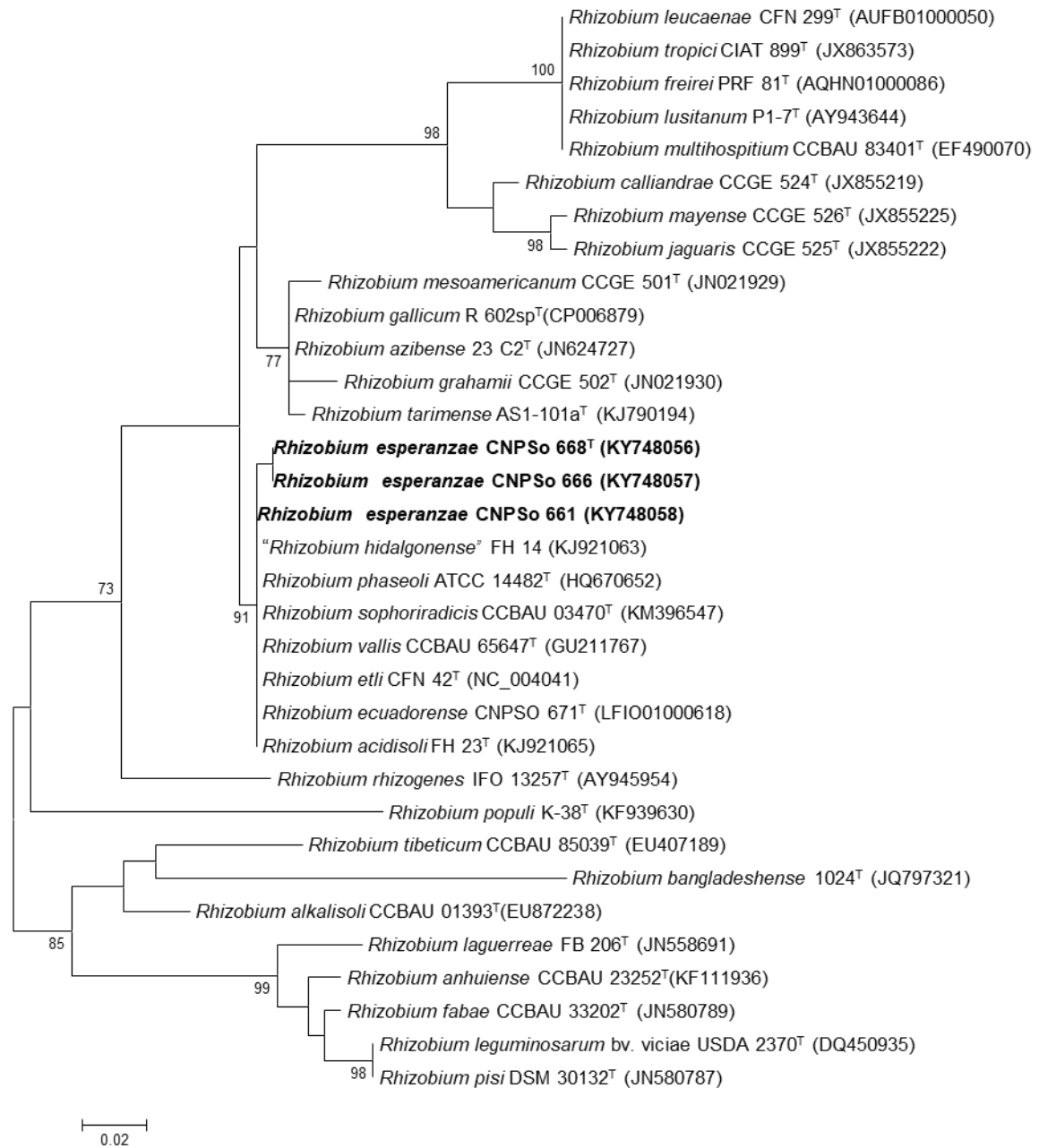


Fig. S7. Maximum likelihood phylogram based on *nifH* (386 bp) gene sequences. Accession numbers are indicated in parentheses. *Rhizobium esperanzae* strains are shown in bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

CONCLUSÃO

Estudos polifásicos compreendendo análises fenotípicas e genotípicas permitem uma maior compreensão das relações filogenéticas e taxonômicas entre espécies bacterianas. Os resultados obtidos neste estudo com estirpes de rizóbios isoladas de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) no México, considerado como centro de origem/diversidade genética dessa leguminosa, permitiram a identificação de uma nova espécie de bactéria diazotrófica. Para a nova espécie foi proposto e aceito o nome científico *Rhizobium esperanzae*, em homenagem à pesquisadora Esperanza Martínez-Romero, do Centro de Ciências Genômicas, em Cuernavaca, México.

Os resultados deste trabalho realçam a diversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro, uma leguminosa considerada bastante promíscua no estabelecimento de simbioses e abrem novos caminhos de pesquisa para estudos de coevolução da simbiose do feijoeiro.