



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIZA CAROLINE FERRAZ HELENE

**FILOGENIA E TAXONOMIA DE ESTIRPES DOS GÊNEROS
Bradyrhizobium E *Mesorhizobium* ISOLADAS DE SOLOS
DO BRASIL, ÁFRICA DO SUL E AUSTRÁLIA**

LUIZA CAROLINE FERRAZ HELENE

**FILOGENIA E TAXONOMIA DE ESTIRPES DOS GÊNEROS
Bradyrhizobium E *Mesorhizobium* ISOLADAS DE SOLOS
DO BRASIL, ÁFRICA DO SUL E AUSTRÁLIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Dra. Mariangela Hungria

Co-orientador: Dr. Graham O'Hara

Londrina
2019

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

Helene, Luisa Caroline Ferraz.

Filogenia e Taxonomia de estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* isoladas de solos do Brasil, África do Sul e Austrália / Luisa Caroline Ferraz Helene. - Londrina, 2019.
148 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.

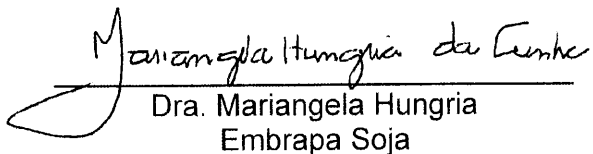
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.
Inclui bibliografia.

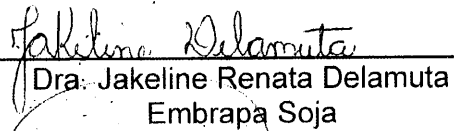
1. Fixação Biológica do Nitrogênio - Tese. 2. Simbiose - Tese. 3. Rizóbio - Tese. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

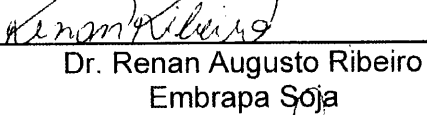
LUIISA CAROLINE FERRAZ HELENE

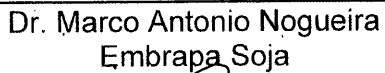
**FILOGENIA E TAXONOMIA DE ESTIRPES DOS GÊNEROS
Bradyrhizobium E *Mesorhizobium* ISOLADAS DE SOLOS DO
BRASIL, ÁFRICA DO SUL E AUSTRÁLIA**


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.


Dra. Mariângela Hungria
Embrapa Soja


Dra. Jakeline Renata Delamuta
Embrapa Soja


Dr. Renan Augusto Ribeiro
Embrapa Soja


Dr. Marco Antonio Nogueira
Embrapa Soja


Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Londrina, 19 de junho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a toda minha família, em especial à minha querida mãe, Hylea Ferraz, e meus queridos avós, Walkyria e Alceu Ferraz (este *in memoriam*), por toda paciência, confiança, apoio e incentivo em todas as etapas deste processo – essa conquista também é de vocês!

Agradeço à minha orientadora, Dra. Mariangela Hungria, que me proporcionou essa oportunidade, orientando-me não só profissionalmente, mas também no âmbito pessoal, tornando possível que eu chegasse ao fim de mais uma fase de minha formação. Saiba que a tenho como um grande exemplo!

Ao meu orientador no exterior, Dr. Graham O'Hara, pelo convite, incentivo e orientações que permitiram a realização de parte dessa tese na Austrália, com uma excelente equipe de pesquisadores e outros profissionais que me acolheram e compartilharam suas diversas experiências. Ao Dr. Jason Terpolilli, pesquisador que, como co-orientador, por muitas vezes me auxiliou em decisões importantes, contribuindo com minhas pesquisas no exterior.

À minha amiga de laboratório, Jakeline Delamuta, que com muita paciência acompanhou cada etapa desenvolvida desta tese, enriquecendo, assim, significativamente, os meus estudos. Jake, sem você as dificuldades seriam muito maiores, obrigada! Agradeço também à minha outra amiga de laboratório, Talitha Rogers, que tantas vezes me ajudou nos processos realizados no exterior, dentro e fora dos laboratórios, tornando-se uma pessoa extremamente importante não apenas nesta etapa, mas também em minha vida pessoal. Obrigada pelo apoio, confiança e pelas longas e frutíferas conversas.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira e a todos os colegas de laboratório, que tanto me ajudaram em diversos experimentos, principalmente ao Renan Ribeiro, Ligia Chueire, Eduara Ferreira e Dona Rosa. Sou imensamente grata por vocês terem feito de nosso ambiente de trabalho um lugar agradável e descontraído.

Muito obrigada ao grupo de pesquisa *Centre for Rhizobium Studies* (CRS), em especial Dr. John Howieson, Dr. Brad Nut, Dr. Ron Yates, Regina Carr e Rob Harris, por me ajudarem a realizar parte de minhas pesquisas na Austrália e por compartilharem comigo seus conhecimentos, meu período aí foi inestimável.

Obrigada a todos os amigos que me apoiaram e encorajaram, e a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a conclusão desse meu doutorado.

Finalmente, agradeço à Embrapa Soja e seus funcionários, por disponibilizarem toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho. Sou imensamente grata também ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEL e à *Murdoch University*, principalmente aos professores que comigo compartilharam seus conhecimentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelas bolsas de doutorado que viabilizaram a realização desta tese, e sem as quais eu não poderia ter chegado a seu término.

ACKNOWLEDGMENTS

First of all, I would like to thank my entire family, especially my dear mother, Hylea Ferraz, and my beloved grandparents, Walkyria and Alceu Ferraz (this in memoriam), for all patience, trust, support and encouragement at all stages of this process – this achievement is yours too!

I am grateful to my supervisor, Dr Mariangela Hungria, who provided me with this opportunity, guiding me not only professionally but also personally, making it possible for me to reach another phase of my development. Know that I consider you to be a great mentor!

To my overseas supervisor, Dr Graham O'Hara, for the invitation, encouragement, and guidance that allowed that part of this thesis to be carried out in Australia, with an excellent group of researchers and other professionals who welcomed me and shared their experiences. To Dr Jason Terpolilli, a researcher who, as a co-supervisor, often assisted me in important decisions, contributing with my research.

To my laboratory friend, Dr Jakeline Delamuta, who with great patience accompanied every stage of this thesis, thus enriching, significantly, my studies. Jake, without you the difficulties would be much greater, thank you! I am also grateful to my other lab friend, Talitha Rogers, who has often assisted me in the processes carried out abroad, in and out of the labs, becoming an extremely important person not only at this stage, but also in my personal life. Thank you for your support, your trust and for the long and fruitful conversations.

To Dr Marco Antonio Nogueira and to all the laboratory colleagues who helped me in my experiments, especially Dr Renan Ribeiro, Ligia Chueire, Eduara Ferreira and Dona Rosa. I am immensely grateful that you have made our work environment a pleasant and relaxed place.

Thank you very much to the Center for Rhizobium Studies (CRS), in particular Prof. John Howieson, Dr Brad Nut, Dr Ron Yates, Regina Carr and Rob Harris, for helping me to carry out part of my research in Australia, and for sharing your experience and expertise, my time there was invaluable.

Thank you to all the friends who supported and encouraged me and all those who somehow collaborated in, and contributed to, the completion of my Ph.D.

Finally, I thank *Embrapa Soja* and its staff for providing all the necessary structure and access for the development of this work. I am immensely grateful to UEL's Department of Biotechnology and Murdoch University, especially to the professors and academics who shared their knowledge with me.

To CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*), for the Ph.D fellowships that made this thesis feasible, without which I could not have made it through.

HELENE, Luisa Caroline Ferraz. **Filogenia e taxonomia de estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* isoladas de solos do Brasil, África do Sul e Austrália**. 2019. 148 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O nitrogênio (N) interfere diretamente na produção agrícola e na nutrição animal e humana. Com o aumento dos impactos ambientais, é de suma importância que tecnologias sustentáveis sejam empregadas para manter a qualidade da vida no planeta Terra. Uma dessas tecnologias consiste no uso de inoculantes contendo microrganismos diazotróficos, alguns dos quais, conhecidos como rizóbios, são capazes de se associarem simbioticamente com algumas espécies de plantas, realizando o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Para que seja possível utilizar dos benefícios desse grupo de bactérias na produção de alimentos e recuperação de solos degradados, é necessário que haja uma extensiva gama de estudos que objetivam isolar, identificar e caracterizar cada estirpe, a fim de que sejam eleitas as com melhor desempenho para serem testadas e utilizadas em larga escala via aplicação como inoculantes. Neste trabalho, três estudos utilizaram um conjunto de metodologias para avaliar a diversidade e caracterizar taxonomicamente grupos de rizóbios, bem como para testar a capacidade de nodulação e FBN em simbiose com diversas leguminosas. No Estudo 1 foi realizada uma análise polifásica com duas estirpes (SEMIA 6399^T e SEMIA 6404) do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*), uma leguminosa nativa do Brasil utilizada para a produção de madeira. Os resultados levaram à descrição da nova espécie *Bradyrhizobium mercantei*, e à publicação do genoma da estirpe tipo. No Estudo 2 foi conduzida uma análise polifásica com quatro estirpes isoladas de amostras de solos da Mata Atlântica, utilizando como plantas-isca *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa pudica*. As quatro estirpes (CNPSO 3140^T, CNPSO 3235, CNPSO 3236 e CNPSO 3237) são representantes de uma nova espécie do gênero *Mesorhizobium*, denominada como *Mesorhizobium atlanticum*. No Estudo 3, 18 estirpes isoladas de amostras de solos da Austrália Ocidental, utilizando diversas leguminosas como plantas-isca, e mais três estirpes provenientes de solos da África do Sul, isoladas de *Glycine* sp., foram analisadas com o objetivo de investigar a diversidade das estirpes. As 21 estirpes são representantes do gênero *Bradyrhizobium*, havendo grande diversidade genética entre elas. Sete grupos foram apontados como possíveis novas espécies, enquanto as demais estirpes são representantes de espécies já descritas. Os três estudos contribuem para um melhor entendimento sobre a diversidade dos rizóbios, indicando que ainda é necessário conduzir vários estudos para elucidar essa diversidade em solos tropicais.

Palavras-chave: Fixação biológica do nitrogênio. Simbiose. Taxonomia. Filogenia. Rizóbios.

HELENE, Luisa Caroline Ferraz. **Phylogeny and taxonomy of *Bradyrhizobium* and *Mesorhizobium* strains isolated from Brazil, South Africa and Australia.** 2019. 148 p. Thesis (Doctorate Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Nitrogen (N) directly interferes with agricultural production and animal and human nutrition. With increasing environmental impacts, it is of the utmost importance to use more sustainable technologies to maintain the quality of life. One of these technologies consists on the use of inoculants containing diazotrophic microorganisms, some of which, known as rhizobia, are able to associate symbiotically with some plant species, establishing the biological nitrogen fixation process (BNF). In order to make use of the benefits of this bacterial group in food production and recovery of degraded soils, it is necessary to perform extensive studies aiming to isolate, identify and characterize each strain, so that elite rhizobia can be recognized, tested and applied in large scale, via inoculation. In this work, three studies used a group of methodologies aimed at assessing the diversity and at taxonomically characterizing rhizobial groups, as well as to evaluate the capacity of nodulation and BNF in symbiosis with several legumes. In Study 1, a polyphasic analysis was performed with two strains (SEMIA 6399^T and SEMIA 6404) of the genus *Bradyrhizobium* isolated from *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*), a legume plant indigenous of Brazil and used for wood production. The results led to the description of the new species *Bradyrhizobium mercantei*, as well as to the genome publication of the type strain. In Study 2 a polyphasic analysis was conducted with four strains isolated from soil samples from the Atlantic Forest, using *Phaseolus vulgaris* and *Mimosa pudica* as trap hosts. Four strains (CNPSO 3140^T, CNPSO 3235, CNPSO 3236 and CNPSO 3237) belong to a new species of the genus *Mesorhizobium*, for which the name *Mesorhizobium atlanticum* was given. In Study 3, 18 strains isolated from soil samples from Western Australia, using different legumes trap, and further three strains isolated from South African soils trapped by *Glycine* spp. were analyzed to investigate the diversity of the group. The 21 strains are representative of the genus *Bradyrhizobium*, with high genetic diversity among them. Seven groups were designated as putative new species, and other strains were classified in known species. The three studies have contributed to a better understanding of the global diversity of rhizobia, and show that much more has to be done to increase the knowledge about this diversity in tropical soils.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Symbiosis. Taxonomy. Phylogeny. Rhizobia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação dos passos básicos que envolvem o processo de nodulação na maioria das leguminosas19
- Figura 2:** Fluxograma de classificação de espécie com base no genoma28
- Figura 3:** Representação esquemática da montagem dos vasos com amostra de solo para isolamento de rizóbios utilizando leguminosas como planta-isca36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Iniciadores e ciclos de amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>housekeeping</i>	41
Tabela 2:	Iniciadores e ciclos de amplificação e sequenciamento dos genes simbióticos.....	42
Tabela 3:	Quantidade de amostra de produto da reação de PCR purificado utilizada na reação de sequenciamento pela <i>Australian Genome Research Facility</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ABT	Azul de Bromotimol
AGR	<i>Australian Genome Research Facility</i>
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i>
CRS	<i>Centre for Rhizobium Studies</i>
DO	Densidade óptica
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
HDD	Hibridação DNA-DNA
HDDd	Hibridação DNA-DNA digital
ICSB	<i>International Committee on Systematic Bacteriology</i>
ICSP	<i>International Committee on Systematic of Prokaryotes</i>
LB	Luria-Bertani
LCOs	Oligossacarídeos lipoquitínicos (<i>lipochitooligosaccharides</i>)
LSTM	<i>Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéenes</i>
ML	<i>Maximum likelihood</i>
MLSA	<i>Multilocus sequence analysis</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OGRI	Overall genome related index
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
rep-PCR	<i>Repetitive sequence-based PCR</i>
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic</i>
VC	Vermelho Congo
YMA	<i>Yeast extract manitol</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO	16
2.2	A SIMBIOSE E A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	17
2.3	TAXONOMIA DE PROCARIOTOS E ANÁLISE POLIFÁSICA	21
2.4	FERRAMENTAS TAXONÔMICAS MOLECULARES	24
2.5	TAXONOMIA E DIVERSIDADE DOS RIZÓBIOS	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	RECUPERAÇÃO, ISOLAMENTO, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ARMAZENAMENTO DAS ESTIRPES	35
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA.....	37
4.3	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FILOGENÉTICA.....	39
4.3.1	Extração de DNA Genômico	39
4.3.2	Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) e Análise dos Produtos da Reação de BOX-PCR	39
4.3.3	Reações de Sequenciamento de Genes Isolados	42
4.3.4	Filogenia dos Genes Isolados e <i>Multilocus Sequence Analysis</i>	43
4.3.5	Sequenciamento de Genoma, <i>Average Nucleotide Identity</i> e Conteúdo G+C.....	44
4.3.6	Teste de Nodulação e Eficiência de Fixação de N ₂	45
5	REFERÊNCIAS	46
6	ESTUDO 1	59
7	ESTUDO 2	81
8	ESTUDO 3	95
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	142

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é indispensável para a vida, sendo um nutriente limitante ao crescimento vegetal, o que interfere diretamente na produção agrícola e repercute na segurança alimentar e no meio ambiente. A demanda por alimentos cresce proporcionalmente ao crescimento populacional, assim como os impactos ambientais causados ao planeta Terra. Sendo assim, torna-se necessário aumentar a produção de alimentos utilizando tecnologias sustentáveis e que preservem o meio ambiente.

O solo é o habitat de muitas plantas e microrganismos que desempenham um papel crucial na ciclagem de nutrientes e, como resultado, colaboram no equilíbrio dos ecossistemas. As atividades agrícolas podem alterar a composição do solo, interferindo na fertilidade e na diversidade ali presentes, causando degradação do ambiente e, muitas vezes, impedindo sua reutilização sem que haja um manejo de alto custo ou degradante.

Diante desse cenário, destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), realizada por alguns microrganismos presentes no ambiente, principalmente bactérias do solo, que podem fornecer quantidades substanciais de nitrogênio (N) para as plantas. Bactérias com maior capacidade de FBN para cada cultura podem ser selecionadas e aplicadas via inoculação. Empregar essa tecnologia em sistemas de produção agrícola resulta no aumento do rendimento das culturas e redução na utilização de fertilizantes nitrogenados, insumos esses que, além de custosos, impactam negativamente o meio ambiente.

As bactérias simbióticas são coletivamente denominadas rizóbios, sendo capazes de estabelecer relações com diversas plantas, principalmente leguminosas (família Fabacea), cuja interação é responsável pela mais eficiente contribuição de N. Essa associação simbiótica é bastante íntima, necessitando de compatibilidade entre os organismos envolvidos para que o processo seja efetivo. Sendo assim, para maximizar a FBN é preciso caracterizar a diversidade genética e funcional dos microrganismos implicados, bem como de suas relações com a planta hospedeira e o meio ambiente.

A ciência encarregada pela identificação, classificação, e que nomeia os seres vivos é conhecida por taxonomia, sendo responsável por caracterizar e organizar os grupos de indivíduos de acordo com suas semelhanças e diferenças, a

fim de facilitar a investigação do nível de diversidade entre eles e suas possíveis aplicações. A taxonomia é fundamental para a ciência microbiana e são várias as análises que ajudam a determinar em qual grupo um organismo deve ser alocado, ou se ele pertence a um grupo novo que deve ser caracterizado, classificado e descrito.

A evolução tecnológica e das ferramentas moleculares não só permitiu grande avanço das análises taxonômicas, como também resultou em um incremento no número de espécies e grupos de organismos conhecidos. Hoje a caracterização de procariotos utiliza a abordagem polifásica para organizar as espécies, que envolve o estudo do conjunto das características fenotípicas, genotípicas e as relações filogenéticas entre os indivíduos. Além dessas informações, o sequenciamento total de genomas tem oferecido uma maior compreensão da natureza genética dos microrganismos, sendo cada vez mais utilizado e requisitado em estudos de descrição de espécies. Essas ferramentas vêm colaborando para uma melhor caracterização e organização dos grupos de bactérias, passo essencial para conhecer cada indivíduo, verificar suas funções e aplicabilidades, e estudar a possibilidade do emprego dos mesmos em áreas de interesse, a fim de melhorar a qualidade de vida e os processos biotecnológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é um elemento crítico para a vida na Terra, por ser um macronutriente constituinte dos ácidos nucleicos, aminoácidos, hormônios, clorofila e outros componentes orgânicos de importância biológica. Mesmo sendo um elemento abundante na atmosfera terrestre, constituindo 78 % na forma de N₂ (nitrogênio diatômico), a forte tripla ligação covalente que une os dois átomos torna a molécula biologicamente indisponível para ser utilizada pela maioria dos organismos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; HOFFMAN et al., 2014). Conseqüentemente, para ser metabolizado, o N₂ precisa ser convertido em formas biologicamente ativas, como a NH₃ (amônia), o NH₄⁺ (íon amônio) e o NO₃⁻ (nitrato). Essa conversão é conhecida como fixação do nitrogênio, e pode ocorrer de forma natural, como por descargas elétricas, vulcanismo, pela ação de microrganismos denominados diazotróficos, via processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN), ou por reações químicas, pelo processo Haber-Bosch, realizado na síntese de fertilizantes nitrogenados, em reações que demandam altas pressões e temperaturas (GALLOWAY et al., 2004; BOODY; DEVORE, 2006; BASI et al., 2011; CARVALHO et al., 2014).

Para as plantas, o N é considerado nutriente limitante de crescimento, uma vez que altas quantidades do elemento são necessárias para o desenvolvimento vegetal. Como consequência, a disponibilidade de N influencia diretamente a produção agrícola, qualitativa e quantitativamente, interferindo na nutrição animal e humana. Com o crescimento progressivo da população e dos impactos causados ao meio ambiente, existe a necessidade de aumentar a produção e a qualidade dos alimentos e também de recuperar ambientes degradados, utilizando tecnologias baratas e sustentáveis (GALLOWAY et al., 2004; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). O solo é um vasto hábitat de plantas e microrganismos essenciais para a manutenção da ciclagem de nutrientes, sendo assim, atividades que alterem sua estrutura e composição também interferem na sua diversidade e fertilidade e, conseqüentemente, impactam o desenvolvimento destes organismos e a produção agrícola (YOUNG; CRAWFORD, 2004; SCHULZ et al., 2013).

O uso de fertilizantes nitrogenados apresenta baixa eficiência, uma vez que existem grandes perdas por desnitrificação e volatilização, com a emissão de gases que contribuem para o efeito estufa e, também, por lixiviação, causando contaminação de cursos e reservatórios de água (MCNEILL; UNKOVICH, 2007; HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008). Considerando apenas a cultura da soja no Brasil, estima-se que, por ano, através da FBN deixam de ser emitidos aproximadamente 60 milhões de toneladas de equivalentes de CO₂ (FUNDAÇÃO AGRISUS, 2017). Estima-se também que a contribuição global para diferentes ecossistemas seja da ordem de 258 milhões de toneladas de N por ano (PORTAL EMBRAPA, 2019). Dessa maneira, nas culturas em que for possível, deve-se substituir os fertilizantes nitrogenados pela FBN, diminuindo os impactos ambientais causados pela produção e aplicação dos mesmos.

Além dos benefícios à produção agrícola e ao meio ambiente, em 2015 estimou-se uma economia, para o Brasil, de US\$ 15 bilhões anuais com o uso da tecnologia de inoculação, isso somente na produção de soja (HUNGRIA; MENDES, 2015); esse valor anual já pode estar em torno de US\$ 20 bilhões (FUNDAÇÃO AGRISUS, 2017). A FBN é um processo natural de grande relevância para a agricultura mundial, estimando-se um aporte de N na Terra equivalente a 65 % do total (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Para entender e gerenciar efetivamente o ciclo global do N é necessário que haja uma determinação precisa da entrada desse elemento no planeta e de todo processo de FBN (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008).

2.2. A SIMBIOSE E A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Existem diferentes espécies e níveis de associações com as plantas relacionados à FBN, porém, os agentes de fixação mais importantes nos sistemas agrícolas estão relacionados às associações simbióticas entre diversas leguminosas produtoras de grãos, forragens, adubos verdes, e arbóreas, e os microrganismos conhecidos por rizóbios, bactérias simbióticas capazes de induzirem a formação de nódulos em grande parte dessas espécies (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008). As leguminosas formam um grande grupo de plantas que constituem a terceira maior família das angiospermas (aquáticas e terrestres) incluindo, aproximadamente, 20 mil espécies em 750 gêneros (PEIX et al., 2015). A família à

qual pertencem é a Fabaceae (=Leguminosae), que atualmente compreende seis subfamílias: Faboideae (=Papilionoideae), Caesalpinioideae (inclui o grupo Mimosoideae), Dialioideae, Detarioideae, Cercidoideae e Duparquetioideae (LPWG, 2017). A associação simbiótica entre esses organismos é resultante de milhares de anos de evolução, alcançando uma combinação íntima, denominada simbiose, onde as bactérias fixam N_2 atmosférico e o disponibilizam para as plantas em troca de abrigo e fontes de carbono (C) essenciais para a manutenção do metabolismo bacteriano e da FBN (SPRENT, 2007; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; FAGAN et al., 2007; BARAL; SILVA; IZAGUIRRE-MAYORAL, 2016).

As bactérias simbióticas são capazes de invadir as células vegetais e provocar mudanças estruturais e funcionais na raiz, resultando na formação dos nódulos, estruturas que hospedam os rizóbios e são especializados para conduzir o processo de FBN; em poucos casos os nódulos se formam no caule de algumas plantas. Na maioria das leguminosas em que ocorre a nodulação o processo inicia com a exsudação, pelas raízes do hospedeiro, de uma série de moléculas que atraem os rizóbios por quimiotaxia. A seguir, ocorre a exsudação de moléculas sinalizadoras, em geral flavonoides, que vão desencadear a transcrição dos genes de nodulação nas bactérias. A expressão dos genes de nodulação resulta na síntese de fatores Nod, que são oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs) produzidos como metabólitos secundários. Os fatores Nod são indispensáveis ao reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira, e induzem acentuada multiplicação celular do córtex na raiz (SANTOS; REIS, 2008; RIBEIRO et al., 2015; BARAL; SILVA; IZAGUIRRE-MAYORAL, 2016).

Com a colonização da superfície das raízes, os pelos radiculares sofrem encurvamento ocorrendo, também, uma degradação local da parede celular, formando um cordão de infecção, por onde as bactérias são capazes de invadir a planta. O cordão de infecção cresce em sentido ao córtex da raiz e as bactérias se estabelecem, se multiplicam e se diferenciam, tornando-se bacteroides, formas especializadas no processo de FBN (HUNGRIA et al., 1994; FAGAN et al., 2007; SANTOS; REIS, 2008). Dependendo da leguminosa os nódulos induzidos podem ser indeterminados, com crescimento apical meristemático, ou determinados, com crescimento pela expansão das células infectadas na região central dos nódulos. A Figura 1 ilustra a comunicação entre os simbiontes e o processo de infecção na

grande maioria das leguminosas, mas é importante comentar que, em algumas espécies, ocorrem outros tipos de infecção e formação de nódulos (SPRENT, 2007).

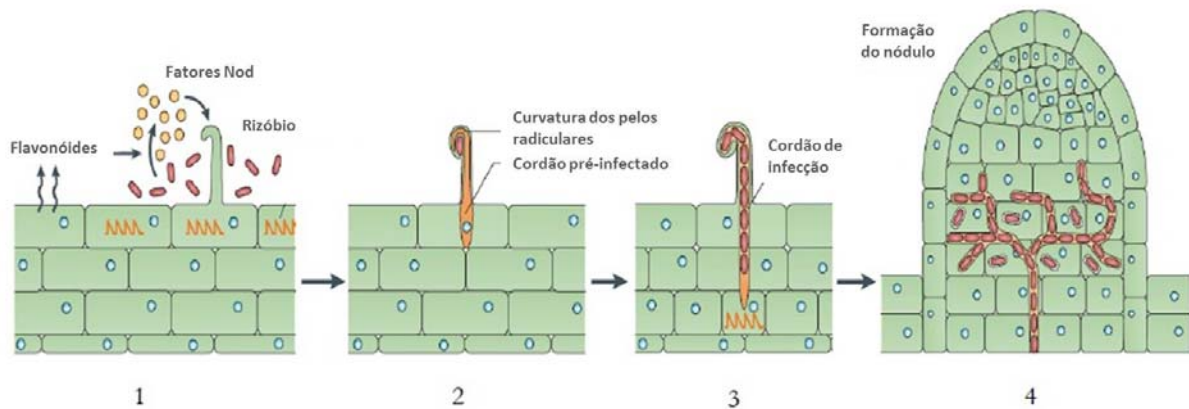
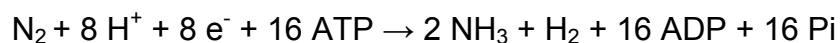


Figura 1: Representação dos passos básicos que envolvem o processo de nodulação na maioria das leguminosas. (1) Os flavonoides exsudados pela planta hospedeira induzem a síntese dos fatores Nod nos rizóbios. Os pelos radiculares percebem esses fatores Nod e estimulam a divisão das células corticais que levam à organogênese; (2) A curvatura dos pelos radiculares encapsula a bactéria aderida; (3) O cordão de infecção é formado devido à invaginação da extremidade do pelo radicular, ficando ocupado por bactérias em processo de divisão; (4) O cordão se divide, as bactérias invadem as células da planta, se diferenciam em bacteroides e iniciam o processo de fixação do N.

Fonte: adaptado de OLDROYD, 2013.

O processo de FBN só é possível pela capacidade das bactérias sintetizarem o complexo enzimático conhecido por dinitrogenase, que recebe elétrons da ferredoxina para realizar a reação. A dinitrogenase é um dímero formado por duas unidades proteicas: a Ferro (Fe) proteína e a Molibdênio-Ferro (MoFe) proteína, que são responsáveis pela redução do N_2 a NH_3 , através da equação:



Todo o processo de fixação demanda alta quantidade de energia em forma de ATP, e condições dentro do nódulo favoráveis para o funcionamento do complexo, que inclui um ambiente microaeróbico, visto que a enzima é sensível ao oxigênio livre. Essa sensibilidade se dá devido à superfície exposta do aglomerado da proteína que liga as duas subunidades do dímero, sendo irreversível a inativação causada pela tensão de oxigênio (DIXON; KAHN, 2004; FAGAN et al., 2007). No nódulo, esse problema é solucionado pela planta com a produção da proteína leghemoglobina, cuja função é controlar a disponibilidade do oxigênio no simbiossoma (OTT et al., 2005). O simbiossoma consiste em uma ou poucas células bacterianas revestidas por uma membrana derivada da planta que pode ser chamada de peribacteriíode ou

membrana do simbiossoma (LIMPENS et al., 2005; OVCHINNIKOVA et al., 2011). Com o uso de fotoassimilados no estabelecimento da simbiose, a taxa da fotossíntese é estimulada o que, no caso de simbioses eficientes, acaba por compensar o alto custo energético da FBN. Esse estímulo permite que o período de crescimento da planta e dos grãos aumente, o que pode resultar em maiores rendimentos da cultura (KASCHUK, et al., 2009, 2010).

Outras bactérias endofíticas podem coexistir com os rizóbios nos nódulos, por exemplo, como foi observado em nódulos de *Vigna radiata* por microscopia confocal (PANDYA et al., 2013). Na maioria dos casos os papéis ecológicos dessas bactérias permanecem desconhecidos, porém, elas provavelmente têm um efeito fitossanitário, no crescimento, ou até mesmo na simbiose entre leguminosa-rizóbio. Por muito tempo essas bactérias foram descartadas no isolamento dos rizóbios de interesse, conseqüentemente, muitas informações relacionadas à diversidade desses endofíticos e suas funções ainda não foram esclarecidas (PEIX et al., 2015; MARTÍNEZ-HIDALGO et al., 2017).

A eficiência da FBN depende de fatores bióticos e abióticos, assim como da associação e dos simbioses envolvidos. Existem rizóbios que são capazes de fixarem N_2 com bastante eficiência, porém, não são competitivos comparados com outros microrganismos no ambiente. Por outro lado, existem rizóbios altamente competitivos, capazes de infectar as plantas com facilidade, porém, não fixam N_2 eficientemente; conseqüentemente, se bactérias ineficientes formarem a maioria dos nódulos, o processo de FBN não atingirá a eficiência esperada. Esse problema é maior com plantas capazes de estabelecer simbiose com diversos microrganismos, como o feijoeiro e o sojoeiro, característica conhecida como simbiose promíscua (HUNGRIA; VARGAS, 2000; GRAHAM et al., 2003; YATES et al., 2011; GERDING et al., 2014).

O gene simbiótico *nodC* codifica a N-acetilglucosaminil transferase, enzima envolvida na síntese do fator Nod (NF), desempenhando um papel fundamental na associação rizóbio-leguminosa, sendo o gene mais comumente usado como marcador filogenético relacionado a parâmetros simbióticos, e tornando-se um padrão mínimo para a definição de simbiovars (sv.) (PERRET et al., 2000; VINUESA et al., 2005; BEJARANO et al., 2014; PEIX et al., 2015; DELAMUTA et al., 2017). Rogel e colaboradores (ROGEL et al., 2011) propuseram o termo “simbiovar” para definir um grupo de estirpes capazes de estabelecer simbiose com uma

leguminosa específica. O que define um simbiovar é o espectro de plantas que as linhagens podem nodular, e a definição foi baseada principalmente na filogenia do gene *nodC* e outros genes simbióticos.

Uma vez que o processo de FBN varia dependendo das espécies envolvidas, para melhorar a simbiose e a eficiência da fixação é necessário conhecer a diversidade e as características dos organismos implicados, bem como suas relações com o meio ambiente.

2.3. TAXONOMIA DE PROCARIOTOS E ANÁLISE POLIFÁSICA

A ciência designada para a classificação, nomenclatura e identificação de seres vivos é conhecida por taxonomia. A classificação é responsável pelo arranjo ordenado dos organismos em grupos taxonômicos com base em suas semelhanças, a nomenclatura é um sistema formal para nomeação de organismos segundo códigos internacionais, e a identificação é o processo para distinguir se os organismos, até então desconhecidos, se enquadram nos grupos já existentes. No caso dos microrganismos procarióticos, as regras de nomenclatura internacionais aplicadas são estabelecidas pelo *International Code of Nomenclature of Bacteria* aprovado pela Sessão Plenária do Décimo Quinto Congresso Internacional de Microbiologia, que ocorreu em 1990. Tal código internacional foi publicado em Washington (USA) pela *American Society for Microbiology (ASM)* (SNEATH, 1992; VANDAMME et al., 1996).

A classificação taxonômica só é possível se as estirpes forem ampla e apropriadamente caracterizadas, e um sistema de classificação confiável é essencial para que os cientistas e outros profissionais trabalhem com microrganismos, a fim de observarem o nível de diversidade entre eles e suas possíveis aplicações biotecnológicas (SCHLEIFER, 2009; TINDALL et al., 2010). A taxonomia é fundamental para a ciência microbiana e também oferece informações importantes sobre como a evolução da vida na Terra ocorreu (SUTCLIFFE; TRUJILLO; GOODFELLOW, 2012). Diversas análises ajudam a determinar se uma estirpe pertence a um grupo novo, ou se deve ser alocada em um grupo conhecido. Um dos objetivos finais da taxonomia de microrganismos é conceber um processo de identificação e classificação estável, objetivo e prontamente utilizável por aqueles que não possuem habilidades especiais na área (CHUN et al., 2018).

A taxonomia de procariotos evoluiu, passando por um grande número de mudanças ao longo dos últimos 80 anos, o que resultou não só em um aumento das espécies e grupos conhecidos, como também colaborou para relevantes alterações nos conceitos aplicados à classificação e nomenclatura (OREN; GARRITY, 2014). Editores e revisores de revistas científicas taxonômicas solicitam a taxonomia polifásica como abordagem para a descrição de novas espécies, o que inclui informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas das estirpes em estudo. Além desse conjunto de informações, o sequenciamento total de genoma fornece uma compreensão da natureza genética da espécie microbiana, estabelecendo novas informações para delinear espécies bacterianas e estudar sua filogenia, permitindo também avanços no conhecimento sobre o potencial metabólico do organismo. Os aperfeiçoamentos da tecnologia de sequenciamento têm proporcionado a utilização rotineira de sequências genômicas em diversos campos da microbiologia. Estudos com as informações contidas nos genomas provaram que essas sequências fornecem dados objetivos e confiáveis para taxonomia. Conseqüentemente, essas novas ferramentas vêm sendo gradualmente introduzidas nas práticas da abordagem polifásica (VANDAMME; PEETERS, 2014; CHUN et al., 2018).

As características fenotípicas são aquelas expressas pelo genoma, abrangendo morfofisiologia, composição química, sorologia, entre outros. Esse tipo de caracterização visa fornecer informações sobre a morfologia das células e colônias, o perfil de ácidos graxos e dos exopolissacarídeos, a composição da parede celular, condições de crescimento (pH, temperatura, salinidade, etc), fontes de nutrientes metabolizadas, tolerância a antibióticos, entre outros atributos (VANDAMME et al., 1996; STACKEBRANDT et al., 2002; SCHLEIFER, 2009). Se fosse possível conhecer todos os genes, suas propriedades e funções na célula seria esperado prever os ácidos graxos, lipídeos, moléculas estruturais, e todas suas finalidades, porém, isso não implica que todas essas propriedades sejam realmente expressas pela célula crescendo em condições de laboratório, ou em seu ambiente natural (KÄMPFER; GLAESER, 2012). Também é necessário levar em consideração que as características fenotípicas das bactérias podem ser bastante afetadas por fatores ambientais, tais como temperatura e pH, o que pode modificar a expressão fenotípica, enquanto que as características genéticas não são afetadas por esses fatores (ZHANG et al., 2014). As técnicas que definem essas características são bastante utilizadas na identificação de microrganismos, mas

sozinhas não são capazes de atribuir, sem equívocos, o grupo ao qual o organismo pertence. Sendo assim, são principalmente utilizadas para complementar e sustentar as análises genéticas e filogenéticas.

As características genotípicas são referentes ao código genético, suas análises refletem os perfis de ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo mais confiáveis e informativas. As técnicas utilizadas nessa caracterização englobam sequenciamento de genes, perfis de *fingerprinting*, padrões utilizando enzimas de restrição, hibridação DNA-DNA, entre outras (VANDAMME et al., 1996; STACKEBRANDT et al., 2002; TINDALL et al., 2010). Atualmente, está disponível uma grande quantidade de informações genotípicas de microrganismos em bancos de dados *online*, que podem ser acessados livremente de qualquer parte do planeta, o que possibilitou que as análises moleculares recebessem notabilidade, passando a ser utilizadas com maior frequência (KLENK; GOKER, 2010).

Um passo decisivo para a taxonomia de procariotos teve início com o postulado de que moléculas biológicas amplamente distribuídas entre os seres vivos poderiam ser utilizadas como parâmetros evolutivos (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965). Alguns anos depois foi proposta a utilização das sequências de RNA ribossomal (RNAr 16S, 23S e 5S) para estudos de filogenia de procariotos (WOESE; FOX, 1977; WOESE, 1987; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990), o que se deu pelo fato desses genes codificarem estruturas essenciais à síntese de proteínas, os ribossomos. Deste modo, essas sequências estariam presentes em todos os organismos, sendo consideradas como universais. O gene mais frequentemente utilizado é o 16S RNAr, com aproximadamente 1.500 pb (pares de bases). Mesmo que o gene 23S RNAr aporte mais informações genéticas e, muitas vezes, maior poder de resolução para reconstruções filogenéticas, seu comprimento o torna menos prático nas rotinas de sequenciamento, de modo que as sequências 16S RNAr se tornaram as principais para identificação filogenética de procariotos (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2001; TINDALL et al., 2010). Em 1990, Woese e Fox sugeriram, com base nos genes ribossomais, a divisão taxonômica dos organismos em três domínios: Archaea e Bacteria, reunindo os organismos procariotos, e Eukaria, reunindo os organismos eucariotos, conceito até hoje utilizado. Contudo, foi necessária uma década para que a classificação filogenética passasse a utilizar amplamente as ferramentas moleculares (OREN; GARRITY, 2014).

Já a filogenia é o estudo das relações evolutivas entre os organismos, que no caso dos procariotos é determinada pela utilização de dados moleculares. Hoje é comumente aceito que a classificação bacteriana deve refletir, o máximo possível, as relações naturais entre as bactérias, o que é possível via análise de genes conservados distribuídos em uma população.

Com a era do sequenciamento genômico, os cientistas passaram a estabelecer relações taxonômicas baseadas nas informações evolutivas contidas nos genomas (VANDAMME et al., 1996; THOMPSON et al., 2013). A taxonomia de procariotos teve que rever o processo de descrição de espécies novas nessa era, considerando utilizar mais as informações das sequências completas como identidade apropriada para a nova espécie e minimizar a descrição de características fenotípicas (VANDAMME; PEETERS, 2014). Thompson et al. (2013) consideram que a taxonomia microbiana passaria a ser mais dependente dessas sequências do que da caracterização polifásica, podendo ser substituída pela era da taxonomia genômica microbiana. Afinal, mesmo duas espécies extremamente relacionadas podem ter suas sequências distinguidas a nível nucleotídico (ZHANG et al., 2014). Dentre as análises mais utilizadas que dependem do sequenciamento de genoma estão a *Average Nucleotide Identity* (ANI), Hibridação DNA-DNA digital (HDDd) e o conteúdo G+C.

2.4 FERRAMENTAS TAXONÔMICAS MOLECULARES E VALORES DE DELINEAMENTO

As primeiras pesquisas moleculares utilizavam as sequências dos genes 16S RNAr nos estudos filogenéticos de procariotos mas, após alguns anos, os cientistas passaram a reportar a ocorrência de recombinação e transferência horizontal nesses genes, o que poderia resultar em sequências mosaico, gerando equívocos à filogenia apontada (SNEATH, 1993; VINUESA et al., 2005). Outra desvantagem no uso dos genes ribossomais é que há uma grande dificuldade em discriminar espécies intimamente relacionadas, devido ao alto nível de conservação dessas sequências em determinados grupos de microrganismos, levando a equívocos em filogenias baseadas apenas nestes genes (MARTENS et al., 2007; SCHLEIFER, 2009; LARANJO; YOUNG; OLIVEIRA, 2012).

Inicialmente foi evidenciado que estirpes que compartilham menos de 97 % de similaridade entre as sequências de 16S RNAr não pertencem à mesma espécie

(STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Em 2014, Kim e colaboradores conduziram um estudo mais aprofundado com base em diversos genomas sequenciados e estabeleceram o valor mínimo de similaridade de 98,7 % entre estirpes de mesma espécie. Hoje, considera-se que as análises com base nas sequências ribossomais são de grande importância para relatar a diversidade dos grupos em estudo e, no caso de descrição de novas espécies, ainda são exigidas nas publicações, porém, elas devem ser utilizadas para complementar análises mais confiáveis e informativas (TINDALL et al., 2010), como por exemplo a *MultiLocus Sequence Analysis* (MLSA).

A inclusão de sequências de outros genes com um maior grau de divergência, mas conservadas o suficiente para permitir análises filogenéticas, passou a representar a abordagem alternativa para superar as desvantagens do uso de genes ribossomais anteriormente comentadas (DAI; LIU; FANG, 2012; BERRADA; FIKRI-BENBRAHIM, 2014). Esses genes são conhecidos como *housekeeping*, e codificam proteínas essenciais ao funcionamento da célula, sendo suficientemente conservados para inferir a filogenia dos indivíduos. Além disso, por possuírem uma taxa de evolução mais rápida do que a dos genes ribossomais, essas sequências apontam maior diversidade entre os organismos em estudo (DE VOS, 2012; LARANJO; YOUNG; OLIVEIRA, 2012).

Estudos de filogenia que utilizam os genes 16S RNAr e *housekeeping* consistem na construção de dendrogramas, comumente conhecidos como árvores filogenéticas, baseados em informações fornecidas pelas sequências nucleotídicas, utilizando programas especializados capazes de apontar as relações evolutivas entre os organismos (DE VOS, 2012). As árvores filogenéticas são estimativas das relações entre os indivíduos analisados e seus possíveis ancestrais em comum, e apontam o grau de alterações nucleotídicas que ocorrem ao longo das gerações. As extremidades externas de uma árvore são chamadas de nós externos, e representam os organismos em estudo. Os nós internos representam os ancestrais hipotéticos de cada indivíduo ou grupo de indivíduos, e os ramos que conectam os nós representam a variedade/diversidade entre eles. Ao observar a topologia tradicional de uma árvore filogenética é possível verificar ramos curtos, que apontam uma baixa variabilidade, e ramos longos, que representam maior variabilidade (HALL, 2011), indicando maior ou menor distância evolutiva.

A metodologia de MLSA é baseada no sequenciamento e montagem de sequências concatenadas de vários genes *housekeeping*. Essas sequências

fornece um esclarecimento mais profundo da distância evolutiva, quando comparadas com aquelas obtidas pelas análises exclusivas dos genes isolados (ZEIGLER, 2003; DE VOS, 2012); além disso, atuam como um tampão contra eventos de recombinação ocorridos em uma única sequência. É importante ressaltar que diferentes grupos de microrganismos podem requerer conjuntos de genes específicos (SCHLEIFER, 2009). Essa análise tem sido relatada como uma ferramenta importante nos estudos de diversidade de procariotos e vem sendo utilizada na classificação de grupos taxonômicos (RONG; HUANG, 2012), uma vez que apresenta alto poder de resolução na discriminação em nível de espécie (ZEIGLER, 2003; GEVERS et al., 2005).

Os genes escolhidos para serem concatenados precisam seguir algumas exigências para garantir confiabilidade dos resultados: (I) precisam estar como única cópia no genoma e distribuídos a uma distância de pelo menos 100 kb; (II) devem estar presentes em todos os indivíduos da análise; (III) devem apresentar extensão nucleotídica suficiente para o sequenciamento; (IV) precisam conter informações suficientes para a análise (parcimônia informativa); e (V) o padrão evolutivo dos genes deve apresentar filogenia congruente nos agrupamentos (ZEIGLER, 2003; THOMPSON et al., 2005). Após a escolha dos genes, as sequências são alinhadas e cortadas, deixando uma região comum entre os organismos em comparação, e são posteriormente concatenadas seguindo a mesma ordem. As árvores filogenéticas são construídas com base nessas sequências finais, utilizando modelos matemáticos especializados para relacionarem as estirpes de acordo com sua filogenia (DE VOS, 2012).

Para complementar as informações das árvores filogenéticas, a Identidade Nucleotídica (IN) das sequências (genes isolados e sequências concatenadas) são estimadas. O valor de delineamento geral para sequências concatenadas é de 96 % (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006). Contudo, mesmo existindo um padrão nos limites de delineamento, estes não são absolutos para todos os grupos de microrganismos. Por exemplo, Durán et al. (2014) estudaram o gênero *Bradyrhizobium* por meio desta metodologia, e sugeriram que o valor de 97 % de similaridade nucleotídica para as sequências concatenadas deveria ser considerado como o delineamento espécies, pois reflete melhor o valor de 70 % de associação na hibridação DNA-DNA (HDD) dentro do gênero.

Outra metodologia que foi bastante difundida para delinear novas espécies procarióticas é a HDD. Essa técnica é capaz de calcular a extensão e a estabilidade de fitas nucleotídicas híbridas, resultantes da dissociação e posterior reassociação de uma mistura de dois genomas incubados em condições controladas. Dois parâmetros podem ser determinados: a proporção de associação relativa das fitas, e a temperatura de dissociação (*melting temperature*), que são comparados com valores de uma fita original de referência. No caso da proporção de associação das fitas, parâmetro mais visado na discriminação de espécies, o valor é comparado com 100 % de associação da fita original (ROSSELLÓ-MÓRA; URDIAIN; LÓPEZ-LÓPEZ, 2012). Caso a fita híbrida apresente mais de 70 % de associação e uma temperatura de dissociação inferior a 5 % de diferença em relação à fita original, as estirpes são consideradas como pertencentes à mesma espécie (SCHLEIFER, 2009). Antigamente, essa metodologia era requerida nos estudos em que estirpes de um provável novo grupo apresentassem mais de 97 % de similaridade nas sequências 16S RNAr; nesses casos, uma HDD deveria ser conduzida entre cada estirpe tipo relevante para certificar diferenças suficientes que sustentassem a classificação do novo grupo (TINDALL et al., 2010). Posteriormente a HDD passou a ser requisito de descrição de espécies, mas hoje, a técnica tradicional é raramente utilizada.

O desenvolvimento da metodologia de HDD permitiu a comparação indireta de sequências gênicas (TINDALL et al., 2010). Contudo, mesmo sendo bastante relevantes, tais experimentos se tornaram impopulares entre os taxonomistas, principalmente pela variabilidade relacionada à metodologia, com necessidade de comparação com vários padrões, e impossibilidade de comparação de resultados entre ensaios. Assim, o número de laboratórios que continuam a realizar esse tipo de avaliação é limitado (ROSSELLÓ-MÓRA; URDIAIN; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012; RAMOS et al., 2011; OREN; GARRITY, 2014). Como consequência dessas desvantagens e pelo fato de que o valor da HDD reflete o parentesco ou a similaridade entre dois genomas, pesquisadores têm focado em aprimorar análises que forneçam um valor análogo ao da HDD. Esses valores vêm de análises de genomas e são relacionados à similaridade ou distância, sendo conhecidos como *Overall Genome Related Index* (OGRI) (CHUN; RAINEY, 2014). Os OGRIs podem ser utilizados para avaliar se uma estirpe pertence a uma espécie, isso é feito pelo cálculo da relação entre sequências genômicas das estirpes em estudo e estirpes tipos ou de referência da espécie conhecida. As metodologias de ANI e a hibridação

DNA-DNA digital (HDDd) vêm sendo amplamente utilizadas, tendo como valores de delineamento de espécies entre 95 - 96 % e 70 %, respectivamente, valores que equivalem aos 70 % da HDD tradicional (GORIS et al., 2007; RICHTER; ROSSELLÓ-MORA, 2009; MEIER-KOLTHOFF et al., 2013). Somente estirpes que apresentarem 98,7 % ou mais de similaridade do gene 16S RNAr com espécies relacionadas devem ser selecionadas para calcular o OGRI. A Figura 2 mostra um fluxograma do processo de reconhecimento de espécies novas utilizando as análises genéticas e genômicas.

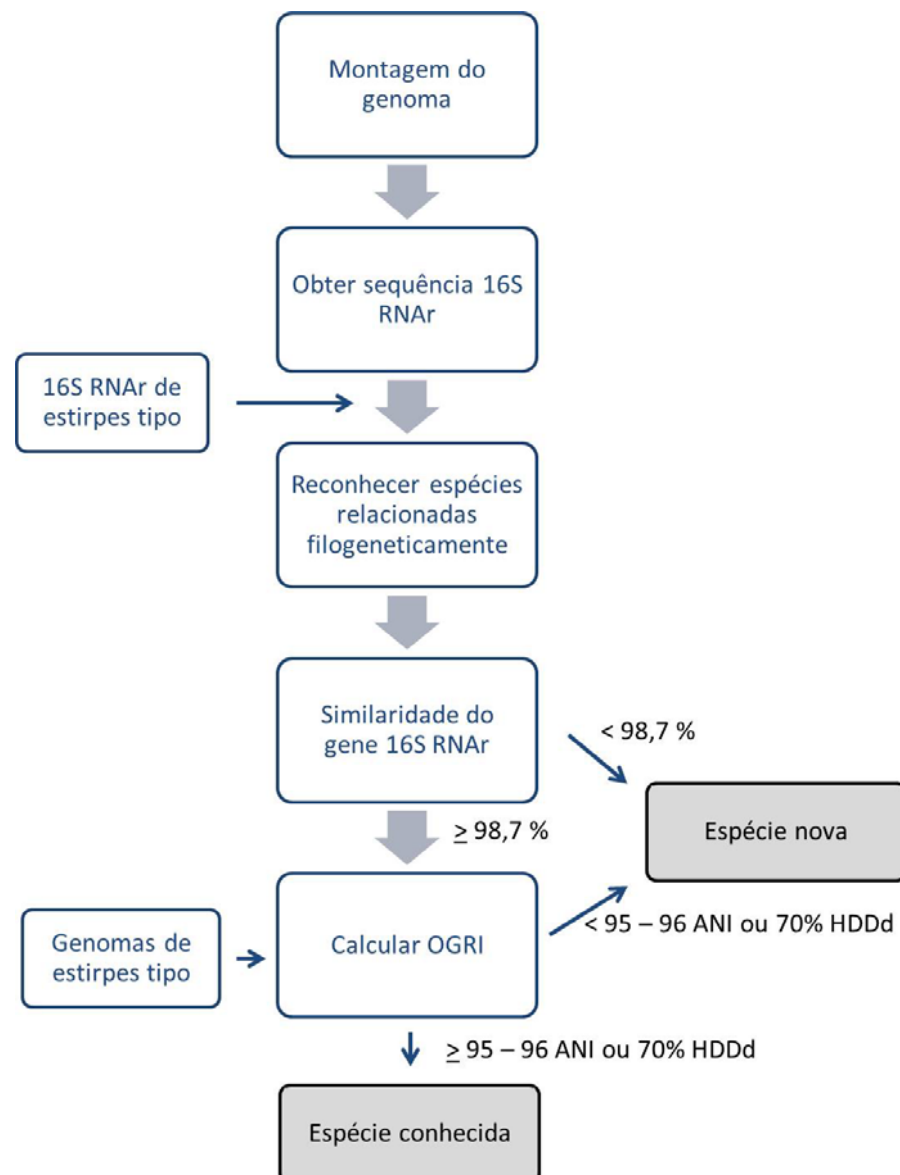


Figura 2: Fluxograma de classificação de espécie com base no genoma.

Fonte: Adaptado de CHUN et al., 2018.

A ANI é uma metodologia capaz de identificar as diferenças entre indivíduos a nível nucleotídico, podendo ser utilizada para representar em porcentagem a

similaridade entre os mesmos. Essa metodologia se baseia no sequenciamento ou busca em banco de dados do genoma das estirpes em estudo e posterior alinhamento e comparação por bioinformática (*in silico*); o resultado gerado é a porcentagem que reflete a similaridade genômica entre os indivíduos comparados (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006). Primeiramente, Konstantinidis e Tiedje (2005) sugeriram que o valor de 94 % de identidade genômica corresponderia ao tradicional valor de 70 % da HDD, que representava o valor limite para definição de espécie. Posteriormente, os mesmos autores relataram que esse valor deveria ser de 96 %. Atualmente, empregam-se valores de identidade genômica entre 95 - 96 % como o limite para apontar novas espécies procarióticas (RICHTER; ROSSELLÓ-MORA, 2009; CHUN; RAINEY, 2014). De qualquer maneira, uma vantagem do uso dessas técnicas de sequenciamento de genoma é a possibilidade de arquivar as sequências em banco de dados para serem empregadas em outros estudos.

A HDDd também é uma comparação genômica *in silico*, que fornece uma profundidade de resolução confiável para a diferenciação permitindo, também, a reprodutibilidade dos resultados e o depósito das informações em bancos de dados para posteriores análises. O valor original de 70 % de delineamento da HDD continua sendo aplicado na HDDd (AUCH et al., 2010; MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

Com o genoma de uma estirpe sequenciado também é possível calcular seu conteúdo G+C, parâmetro bastante utilizado em taxonomia, sendo um requisito importante para determinar as condições de temperatura das análises de hibridação (TINDALL et al., 2010), pois quanto maior o conteúdo G+C, maior a temperatura necessária para dissociar a fita de DNA. Esse conteúdo também é utilizado como marcador genotípico (MESBAH; WHITMAN; MESBAH, 2012), sendo adotado que a variação de conteúdo entre estirpes de mesma espécie não deve ser superior a 3 mol% e, para o mesmo gênero, não deve ultrapassar 10 mol% (VANDAMME et al., 1996). No entanto, composições de bases de DNA similares não implicam em que duas estirpes sejam intimamente relacionadas (SCHLEIFER, 2009).

Os genomas procarióticos contêm sequências que se repetem e estão distribuídas por todo cromossomo, mas a localização dessas sequências e o número de vezes que se repetem são característicos de cada estirpe (VERSALOVIC et al., 1994). Sendo assim, uma das formas de se avaliar o perfil genômico das espécies é

através de técnicas de *fingerprinting*. Essas sequências são amplificadas utilizando um iniciador específico, com base na presença ou ausência de homologia entre o genoma e o iniciador. As reações resultam em diversos fragmentos de diferentes tamanhos e que, quando separados por eletroforese, revelam um perfil de bandas do genoma analisado (KASCHUK et al., 2006; FAKRUDDIN et al., 2013). Exemplos dessas técnicas são: *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *repetitive sequence-based PCR* (rep-PCR), derivados dos elementos BOX no genoma (BOX-PCR), entre outros. Essas técnicas têm valor limitado para delineamento de espécies, mas se utilizadas adequadamente podem ser aplicadas para identificar variabilidade intraespecífica, que é quando diversas estirpes da mesma espécie apresentam certa heterogeneidade nas propriedades fenotípicas e genotípicas, e também são bastante úteis em demonstrar se um isolado representa um clone (TINDALL et al., 2010; FAKRUDDIN, et al., 2013).

As análises descritas nos parágrafos anteriores são necessárias e de alta relevância para acessar a diversidade microbiana e caracterizar cada grupo de microrganismos, além de permitir avanços nos estudos de ecologia. Somente com o esclarecimento desses fatores e o aprofundamento dos conhecimentos sobre os microrganismos é possível alcançar a competência para utilizá-los em áreas de interesse, como a biotecnologia, a medicina, a agricultura, entre outros.

Como pode ser notado nos estudos citados, a descrição de novas espécies de procariotos requer um amplo processo de caracterização e um padrão de resultados que justifique tal classificação. As regras que devem ser seguidas são estipuladas pelo *International Committee on Systematic Bacteriology* (antigamente ICSB, hoje ICSP, tendo sido alterado para *Prokaryotes*) que faz parte da *International Union of Microbiological Societies*. A ICSP é responsável por revisar e avaliar os testes conduzidos nos estudos e verificar se estão coerentes com os requisitos mínimos para publicação de um novo grupo (ICSP, 1992).

Esses requisitos mínimos envolvem: (I) estipulação de uma estirpe de referência que deve ser depositada em duas coleções de culturas em países distintos; (II) a taxonomia polifásica deve ser a abordagem do estudo; (III) os estudos genéticos devem incluir metodologias de *fingerprinting*; (IV) o gene 16S RNAr deve ser parcialmente sequenciado (mínimo 1300 pb), depositado em banco de dados e o número de acesso estar publicado no estudo; (V) a MLSA também deve ser conduzida com, no mínimo, três genes *housekeeping* e as sequências devem ser

depositadas em banco de dados e ter os números de acesso publicados; (VI) as características fenotípicas e quimiotaxonômicas devem ser acessadas e comparadas com as demais estirpes relacionadas; (VII) a porcentagem do conteúdo G+C deve constar no estudo; (VIII) a estimativa da ANI deve ser realizada entre a estirpe tipo do novo grupo com estirpes de grupos relacionadas; (IX) os valores de referência devem ser obedecidos, sendo 98,7 % de similaridade nucleotídica para 16S RNAr e 96 % na sequência concatenada, 95 - 96 % na ANI, entre outros valores estabelecidos pelo comitê referentes para cada análise. Além disso, é recomendado que a nova espécie tenha, no mínimo, três estirpes para sua descrição, com relevante diversidade intraespecífica. Em casos excepcionais, porém, a descrição com somente uma estirpe pode ser aceita, desde que o estudo apresente a relevância da mesma para a sociedade (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006; STACKEBRANDT; EBERS, 2006; DE VOS, 2012; OREN; GARRITY, 2014; KIM et al., 2014; CHUN et al., 2018).

2.5. TAXONOMIA E DIVERSIDADE DOS RIZÓBIOS

O conceito de espécie bacteriana mudou consideravelmente ao longo do tempo. No início da bacteriologia, os fenótipos induzidos pelos rizóbios em hospedeiros eram essenciais para a definição de espécies. Esses fenótipos são referentes à indução de nódulos em leguminosas, o que originou o termo inoculação cruzada para a definição dos grupos (BALDWIN; FRED, 1929), cuja diferenciação era baseada nas habilidades de nodular determinada planta hospedeira (PEIX et al., 2015; VELÁZQUEZ et al., 2017). Uma grande modificação ocorreu com a descrição da espécie *Rhizobium fredii*, que é de crescimento rápido, capaz de nodular soja (*Glycine max*), planta geralmente nodulada por espécies de crescimento lento do gênero *Bradyrhizobium*. Esse fato iniciou o questionamento sobre o conceito de taxonomia baseada na inoculação cruzada, pois revelou que uma mesma planta poderia ser nodulada por espécies bastante distintas (PEIX et al., 2015).

Por muito tempo acreditou-se que os rizóbios eram um grupo pequeno e pouco distinto mas, hoje, sabe-se que eles compreendem uma importante e vasta diversidade genética, incluindo espécies filogeneticamente divergentes, tanto em sequências de genes centrais (*core genes*), como de genes simbióticos. No início dos estudos de rizobiologia, todos os rizóbios faziam parte de um único gênero,

Rhizobium, descrito por Frank em 1889. Posteriormente, com a aplicação das características fisiológicas, houve a reclassificação da espécie *Rhizobium japonicum* para o novo gênero *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982), onde foram alocadas as estirpes de crescimento lento em meio de cultura, na época com uma única espécie descrita, *Bradyrhizobium japonicum*. Desde então, outras características passaram a ser consideradas no delineamento de espécies (CHEN et al., 1988). O gênero *Mesorhizobium* foi descrito em 1997 por Jarvis e colaboradores, para alocar as estirpes de crescimento intermediário entre os representantes dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (JARVIS et al., 1997).

Com o emprego das técnicas moleculares e a análise de ácidos nucleicos, principalmente dos genes ribossomais 16S, os rizóbios foram incluídos no filo das Proteobactérias, dentro da subdivisão alfa-proteobactérias (WOESE et al., 1984; PEIX et al., 2015). Os estudos dos genes centrais permitiram diversas descrições, mesmo que as características de infecção fossem desconhecidas. O sequenciamento desses genes também permitiu a identificação de outras bactérias dentro dos nódulos, como as do gênero *Burkholderia*, que foram as primeiras beta-proteobactérias descritas como endossimbiontes de leguminosas (MOULIN et al., 2001).

A primeira espécie de rizóbio obtida de uma fonte diferente de nódulos, foi a *Mesorhizobium* sp. estirpe BCN1, isolada de esgoto industrial recebendo resíduos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (NÖRTEMANN, 1992). Posteriormente, muitas espécies provenientes de fontes variadas foram descritas, isoladas de tecidos de plantas, da rizosfera, de raízes e, também, de água, solo, areia, biorreatores, entre outros. Isso mostrou que os rizóbios são altamente variados e estão espalhados em ecossistemas bastante diversos (PEIX et al., 2015).

Os grupos de bactérias capazes de nodular leguminosas são bastante distintos e, em 2019, estão distribuídos entre os gêneros: *Agrobacterium* (CONN, 1942), *Allorhizobium* (LAJUDIE et al., 1998), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982), *Ensifer* (= *Sinorhizobium*) (CASIDA, 1982; CHEN et al., 1988; YOUNG, 2003), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Rhizobium* (FRANK, 1889), *Neorhizobium* (MOUSAVI et al., 2015), *Pararhizobium* (MOUSAVI et al., 2016), *Paraburkholderia* (SAWANA et al., 2015), *Aminobacter* (URAKAMI et al., 1992), *Devosia* (NAKAGAWA et al., 1996), *Methylobacterium* (PATT et al., 1976), *Microvirga* (KANSO; PATEL, 2003), *Ochrobactrum* (HOLMES et al., 1988),

Phyllobacterium (KNÖSEL, 1984), *Shinella* (AN et al., 2006) e *Cupriavidus* (MAKKAR; CASIDA, 1987). Essas espécies carregam genes de nodulação e fixação de N₂ localizados em plasmídeos ou nas chamadas ilhas simbióticas, presentes nos cromossomos. Tais genes determinam a extensão do grupo de hospedeiros e a capacidade e eficiência do processo de FBN (VELÁZQUEZ et al., 2017). A lista completa com a nomenclatura das espécies validadas de rizóbios está em constante atualização, sendo publicada na *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*, que pode ser acessada online (<http://www.bacterio.net/>).

Visando incrementar o conhecimento sobre os rizóbios e descobrir espécies novas para testar sua aplicabilidade biotecnológica, os estudos que elucidam a diversidade e caracterizam esses microrganismos são de extrema relevância, colaborando, também, para a expansão de uma tecnologia sustentável para a agricultura. No caso dos rizóbios, a diversidade é ampla, sendo possível citar diversos estudos recentes que utilizam essas ferramentas para caracterizá-los, como: Ribeiro et al. (2012), Delamuta et al. (2013), Helene et al. (2015a), Cordeiro et al. (2017), Helene et al. (2017a) e Mohamad et al. (2017), que descrevem novas espécies de rizóbios, também como: Helene et al. (2015b), Delamuta et al. (2016), Ribeiro et al. (2017) e Helene et al. (2017b), que caracterizam genomas de rizóbios e, ainda, Ribeiro et al. (2013), Delamuta et al. (2017) e Dall’Agnol et al. (2017), que acessam e relatam a diversidade de grupos rizóbios.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Conduzir análises polifásicas em estirpes de *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* simbiontes de leguminosas provenientes do Brasil, da África do Sul e da Austrália Ocidental, visando investigar sua diversidade taxonômica, filogenética e simbiótica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar fenotipicamente estirpes de *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* em relação à morfologia, condições de crescimento, capacidade de uso de diferentes fontes de carbono, tolerância a antibióticos, perfil de ácidos graxos, dentre outros parâmetros fisiológicos (Estudos 1 e 2);
- b) Caracterizar o perfil genético das estirpes por BOX-PCR (Estudos 1, 2 e 3);
- c) Aplicar a metodologia de *MultiLocus Sequence Analysis* (MLSA) para determinar a posição taxonômica das estirpes (Estudos 1, 2 e 3);
- d) Sequenciar e caracterizar o genoma de estirpes selecionadas como tipo das espécies novas (Estudo 1 e 2);
- e) Analisar a filogenia dos genes de nodulação *nodC* (Estudos 2 e 3) e *nodD* (Estudo 2) e de fixação *nifH* (Estudo 1);
- f) Avaliar a capacidade de nodulação e a atividade do nódulo no processo de fixação do nitrogênio das estirpes em estudo em simbiose com diferentes leguminosas (Estudos 1 e 2);
- g) Integrar as informações polifásicas que suportam a descrição das novas espécies (Estudos 1 e 2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises morfofisiológicas e filogenéticas, incluindo o sequenciamento dos genomas nos Estudos 1 e 2 foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), Londrina, Paraná. No Estudo 3 as análises foram conduzidas nos laboratórios do *Centre for Rhizobium Studies* (CRS) situado na *Murdoch University* em Perth, Austrália Ocidental. As análises de capacidade de nodulação e eficiência da FBN das estirpes em simbiose com diferentes leguminosas foram avaliadas no Laboratório de Biotecnologia de Solos, na Embrapa Soja (Estudos 1 e 2). As análises de perfil de ácidos graxos apresentadas nos Estudos 1 e 2 foram realizadas na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna, São Paulo.

4.1 RECUPERAÇÃO, ISOLAMENTO, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ARMAZENAMENTO DAS ESTIRPES

As estirpes listadas no Estudo 1 foram isoladas no Brasil e estão depositadas na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas (Coleção WFCC # 1213, WDCC # 1054). As estirpes foram recuperadas de ampolas, estriadas em placas de Petri com meio de cultura YMA modificado (extrato de levedura, manitol e ágar, de agora em diante denominada apenas como YMA) (HOWIESON; DILWORTH, 2016) e incubadas a 28 °C por 7 dias, período necessário para a formação de colônias visíveis (VINCENT, 1970). O indicador vermelho Congo (VC) foi adicionado ao meio de cultura, a fim de apontar contaminações. Para a preservação, as bactérias foram crescidas em meio de cultura YM líquido com glicerol (30 % v/v) e criopreservadas a -80 °C e -150 °C.

As estirpes do Estudo 2 foram isoladas em estudo anterior (DALL'AGNOL et al., 2017) e estão listadas na Tabela 1 do Estudo 2. As amostras de solo foram coletadas no estado do Rio de Janeiro em região coberta pelo bioma Mata Atlântica pelo Dr. Sergio Mianna Faria (Embrapa Agrobiologia). Foram utilizadas duas plantas como isca, *Mimosa pudica* e *Phaseolus vulgaris*, e o isolamento das estirpes foi

conduzido como descrito por Dall'Agnol et al. (2017) no *Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéennes* (LSTM), Montpellier, França. As condições de cultivo e estocagem das estirpes são as mesmas descritas no Estudo 1, com exceção do tempo de incubação das estirpes, que foi de três dias. As estirpes também estão depositadas na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas (Coleção WFCC # 1213, WDCC # 1054).

As estirpes do Estudo 3 foram recuperadas da coleção de culturas *Western Australian Soil Microbiology Gene Bank* (Murdoch University, Perth, Austrália Ocidental), como descrito no Estudo 1, ou capturadas e isoladas de amostras de solo coletadas na Austrália Ocidental, utilizando diferentes leguminosas como plantas-isca. Foram utilizadas nove amostras de solos para isolar as bactérias e quatro plantas-isca: *Vigna unguiculata* (feijão-caupi), *Glycine max* (soja), e duas espécies selvagens de *Glycine*, *G. clandestina* e *G. tabacina*. Os vasos foram montados de acordo com a Figura 3 e cada tratamento foi realizado em triplicata.

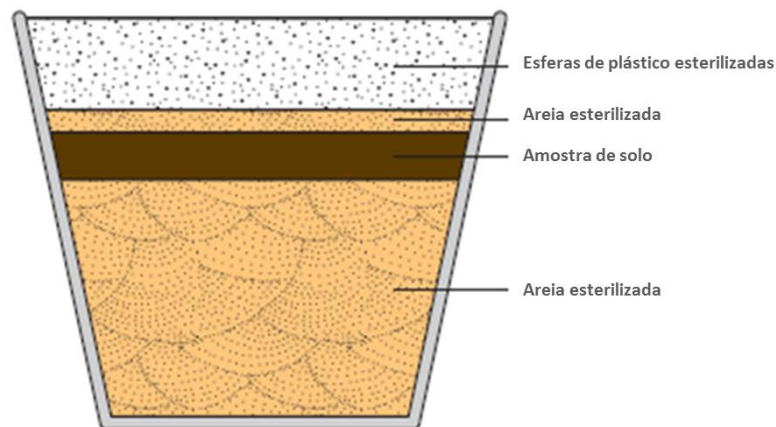


Figura 3: Representação esquemática da montagem dos vasos com amostras de solo para isolamento de rizóbios utilizando leguminosas como planta-isca.

Fonte: adaptado de HOWIESON; DILWORTH, 2016.

As sementes de *Glycine* selvagem passaram por processo de quebra de dormência, com a escarificação em papel lixa fino, etapa que permite a germinação, conforme orientado pela distribuidora de sementes *Nindethana Australian Seeds* (<https://www.nindethana.net.au/>). Todas as sementes passaram por desinfestação de superfície para remover microrganismos contaminantes, processo também realizado nos nódulos antes da maceração para posterior plaqueamento. Para isso, as sementes foram imersas em álcool 70 % por 1 min, hipoclorito de sódio (0,4 – 0,6 %) por 3 min e seis lavagens sucessivas com H₂O esterilizada (HOWIESON;

DILWORTH, 2016). Após a desinfestação, as sementes foram distribuídas em placas com meio ágar/água a 1,5 %. As sementes de *V. unguiculata* e *G. max* foram incubadas a 28 °C e as sementes selvagens permaneceram em temperatura ambiente, todas protegidas da luz durante o processo de germinação. Cada vaso recebeu quatro sementes da mesma espécie e foram mantidos em casa de vegetação por 35 dias, recebendo água e solução nutritiva isenta de N (HOWIESON; DILWORTH, 2016). Após esse período o experimento foi desmontado e os nódulos coletados.

Para o isolamento das bactérias presentes nos nódulos, estes passaram pelo processo de desinfestação de superfície, como citado anteriormente, sendo o tempo de permanência no hipoclorito de sódio reduzido (1,5 minutos) para nódulos muito pequenos, a fim de evitar danos aos microrganismos de interesse presentes na parte interna. As bactérias foram então expostas pela maceração dos nódulos, plaqueadas em meio de cultura YMA com indicador VC e incubadas conforme descrito no Estudo 1. Cada estirpe foi repicada para o mesmo meio até a obtenção de culturas puras. Todas as estirpes do Estudo 3 foram estocadas como descrito no Estudo 1 e também estão depositadas na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas (Coleção WFCC # 1213, WDCC # 1054).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA

As estirpes dos Estudos 1 e 2 foram caracterizadas morfofisiologicamente como descrito por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1994), utilizando meio YM ou YMA. Em todas as demais análises, exceto quando descrito, o tempo de incubação das estirpes nos Estudos 1 e 3 foi de sete dias, e das estirpes do Estudo 2 foi de três dias. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A manifestação do crescimento foi avaliada em meio YMA com VC e classificada entre rápida, intermediária, lenta ou muito lenta, de acordo com o tempo de incubação necessário para a visualização de colônias isoladas, de até 3 dias, de 4 a 5 dias, de 6 a 9 dias ou acima de 10 dias, respectivamente. A produção de muco e sua consistência também foram avaliadas. Após o crescimento, três colônias foram medidas com auxílio de um paquímetro e a média foi registrada em milímetros (mm). Também foi analisada a forma, elevação, tipo de borda e superfície das colônias,

além dos detalhes ópticos da massa de crescimento, que foram definidos entre transparente ou opaco. A alteração da cor do meio YMA com indicador azul de bromotimol (ABT), apontando reação ácida/básica, e a cromogênese das colônias em meio YMA com indicadores ABT e VC também foram avaliadas.

A capacidade de crescimento em diferentes condições foi avaliada em meio YM líquido com pH 4,5, 6,8 e 8,0; com incubação em 28, 37 e 40 °C, sob agitação de 100 rpm. O resultado é classificado entre crescimento positivo, fraco e nulo, dependendo da densidade óptica (DO) mensurada em espectrofotômetro com absorvância de 600 nm e comparada com o controle. O controle é a DO do crescimento ótimo do microrganismo (curva de crescimento), e é considerado crescimento positivo se a DO for maior ou igual a 60 % do controle, fraco se ficar entre 20 e 59 % e nulo de ficar abaixo de 20 % do controle.

Foi registrada a manifestação de crescimento em placas com meio de cultura Luria-Bertani (LB) (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994) e em meio YMA com 1 % de NaCl. Para verificar a atividade da enzima urease, as estirpes foram inoculadas em meio de cultura YMA com 2 % de ureia e indicador de pH vermelho de fenol (0,012 g/L).

Galerias do kit API 50CH da BioMérieux foram usadas para avaliar a capacidade das estirpes de utilizarem 49 fontes de carbono em seu metabolismo. Foi preparado um pré inóculo de cada estirpe em meio YM e incubado a 28 °C sob agitação de 100 rpm. Após o crescimento, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspenso em 5 mL de solução salina a 0,85 %, seguido de uma segunda centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado, o pélete ressuspenso em 2 mL de água destilada esterilizada e transferido para tubo de ensaio também esterilizado, onde a concentração da cultura foi ajustada utilizando água destilada esterilizada até, aproximadamente, 10^9 células por mL. As amostras foram transferidas para um frasco com 10 mL de meio YM-modificado (sem manitol e com indicador ABT), distribuídas nas galerias e incubadas a 28 °C. A intensidade de alteração de cor comparada com o controle (sem fonte de carbono) indica a capacidade das estirpes de metabolizar cada fonte de carbono, e o resultado foi definido como positivo, negativo ou fraco.

A tolerância a antibióticos foi testada pela metodologia de disco-difusão (BAUER; KIRBY, 1966). As estirpes foram inoculadas em meio YM e incubadas a 28

°C sob agitação de 100 rpm. Após o crescimento, 100 mL de cada cultura foram utilizados para inocular placas de Petri com meio YMA, distribuído com alça de Drigalski por toda superfície do meio. Dois discos com concentrações específicas de cada antibiótico foram dispostos no centro de cada metade da placa, que foram incubadas a 28 °C. O tamanho do halo de inibição foi medido com paquímetro e indicou o nível de tolerância respectivo a cada antibiótico.

O perfil de ácidos graxos foi obtido pelo MIDI *Sherlock Microbial Identification System* (SASSER, 2001) utilizando a biblioteca TSBA6. As estirpes foram inoculadas em meio de cultura YMA e incubadas a 28 °C. Após o crescimento as placas foram enviadas sob cuidados do pesquisador Dr. Itamar Soares Melo ao Laboratório de Genômica e Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental, e as análises foram conduzidas utilizando *Agilent GC* modelo 6850 em coluna Ultra 2 (25 m de comprimento, ID 0,2 mm, filme f 0,33 µm), detector FID, carregador de gás (30 mL/min), injetor automático série 7683 (liner 19251-60540), injeção de 2 µL e corrida de 25 min. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C e 300 °C respectivamente. O ciclo de temperatura utilizado foi: início em 250 °C, acrescido de 5 °C por min até 260 °C mantido por 18 min, então acrescido 40 °C por min até 310 °C e mantido por 1,5 min (DELAMUTA et al., 2013).

4.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FILOGENÉTICA

4.3.1 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA total, as estirpes foram inoculadas em meio YM e incubadas a 28 °C sob agitação de 100 rpm. Nos Estudos 1 e 2 a extração do DNA genômico foi realizada com o *kit DNeasy Blood & Tissue* da Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante. No Estudo 3, o kit de extração utilizado foi o *FavorPrep Blood Genomic DNA extraction Mini Kit* da Invitrogen, também seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração do DNA total, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % para verificar a qualidade da extração, tendo como referência o padrão 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). Amostras com fraca intensidade de bandas, indicando baixa concentração de DNA, passaram

por concentrador a vácuo (*Concentrador Plus*, Eppendorf) antes de serem armazenadas em freezer a -20 °C para análises posteriores.

4.3.2 Amplificação dos genes *housekeeping* e simbióticos

A amplificação dos genes 16S RNAr, *housekeeping* (*dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*) e simbióticos (*nifH* e *nodC*) nos três Estudos foi realizada por PCR utilizando iniciadores específicos (Tabelas 1 e 2). Nos Estudos 1 e 2, os iniciadores fD1 e rD1 foram utilizados apenas para amplificação total do gene 16S RNAr (1500 pb), e os iniciadores Y1, Y2, 362f, 786f e 1203f foram utilizados na reação de sequenciamento. No Estudo 3, os iniciadores de amplificação utilizados para amplificar o 16S foram os PA e PH e, para o sequenciamento, foram o Gamma, *Gamma, BKL1, *0, 3 e *3. No Estudo 1 as sequências do gene simbiótico *nodD* foram retiradas dos genomas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI).

Nos Estudos 1 e 2 foi preparada uma mistura para cada reação contendo tampão 10x (Tris-base a 200 mM, KCl a 500 mM em pH 8,4), dNTPs (0,3 mM de cada base), MgCl₂ (1,5 mM), enzima Taq DNA polimerase (1 U), iniciadores referentes a cada gene a ser amplificado (10 pmol/μL), DNA total das estirpes (de 10 a 20 ng/μL) e água ultrapura esterilizada, completando o volume final de 50 μL. No Estudo 3 as reações foram montadas utilizando os respectivos iniciadores, DNA total e *Go-Taq Green Master Mix* (Promega), que contém tampão, enzima, dNTPs e MgCl₂, e o volume final da reação foi de 25 μL.

Os respectivos ciclos de amplificação dos Estudos 1, 2 e 3 estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % para verificar a pureza da reação e tamanho dos fragmentos amplificados, tendo como base o padrão 1 kb DNA Ladder. Todas as amostras dos Estudos 1, 2 e 3 foram purificadas utilizando *kit PureLink Quick PCR Purification* da Invitrogen, seguindo as recomendações do fabricante, e submetidas novamente à eletroforese em gel de agarose, conforme já descrito.

Tabela 1: Iniciadores e ciclos de amplificação e sequenciamento dos genes 16S RNAr e *housekeeping*.

Gene	Iniciador	Sequência 5' - 3'	Ciclos (referência)
16S Estudos 1 e 2	fD1 [#]	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	2min 95°C, 30X (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2min 72°C, 5 min 72°C) (WEISBURG et al., 1991)
	rD1 [#]	CTTAAGGAGGTGATCCAGCC	
	Y1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Sequenciamento: 1 min 96°C, 35X (15s 96°C, 15s 50°C, 4min 60°C) (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer User Guide)
	Y2	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	
	362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	
	786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	
	1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	
16S Estudo 3	PA [#]	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30X (15s 96°C, 1s 35°C, 4min 60°C) (VANCANNEYT et al., 2004)
	PH [#]	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
	*Gamma	CTCCTACGGGAGGCAGCAGT	Sequenciamento: 2min 96°C, 30X (10s 96°C, 5s 50°C, 4min 60°C) (Sanger Sequencing Sample Submission Guide, 2014)
	*O	AACTCAAAGGAATTGACGG	
	*3	AGTCCCGCAACGAGCGCAAC	
	Gamma	ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG	
	BKL1	GTATTACCGCGGCTGCTGGCA	
	3	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	
<i>dnaK</i> Estudos 1 e 3	BRdnaKf	TTCGACATCGACGCSAACGG	2min 95°C, 35X (45s 95°C, 30s 58°C, 90s 72°C), 7min 72°C (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009)
	BRdnaKr	GCCTGCTGCKTGTACATGGC	
<i>glnII</i> Estudos 1, 2 e 3	TSglnIIlf	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	2min 95°C, 35X (45s 95°C, 30s 58°C, 1,5min 72°C, 7 min 72°C) (STEPKOWSKI et al., 2005)
	TSglnIIlr	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTTCG	
<i>gyrB</i> Estudos 1, 2 e 3	gyrB343f	TTCGACCAGAAAYTCCTAYAAGG	5min 95°C, 5X (2min 94°C, 2min 58°C, 1min 72°C) 28X (30s 94°C, 1min 58°C, 1min 72°C, 5 min 72°C) (MARTENS et al. 2007)
	gyrB1043r	AGCTTGTCTTSGTCTGCG	
<i>rpoB</i> Estudo 2	rpoB83f	CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC	5min 95°C, 3X (2min 94°C, 2min 58°C, 1min 72°C) 30X (30s 94°C, 1min 58°C, 1min 72°C, 5min 72°C) (MARTENS et al. 2007)
	rpoB1061r	AGCGTGTTCGGATATAGGCG	
<i>recA</i> Estudos 1, 2 e 3	TSrecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG	2min 95°C, 35X (45s 95°C, 30s 58°C, 90s 72°C), 7min 72°C (STEPKOWSKI et al., 2005)
	TSrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG	

[#] Iniciadores utilizados somente para amplificação.

Tabela 2: Iniciadores e ciclos de amplificação e sequenciamento dos genes simbióticos.

Gene	Iniciador	Sequência 5' - 3'	Ciclos (referência)
<i>nifH</i> Estudo 1	nifHF	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	2min 95°C, 35X (1min 94°C, 45s 60°C, 2 min 72°C), 7 min 72°C (LAGUERRE et al., 2001)
	nifHI	AGCATGTCYTCAGYTCNTCCA	
<i>nodC</i> Estudo 2	nodCF	AYGTHGTYGAYGACGGTTC	30s 94°C, 40X (30s 96°C, 1min 53°C, 30s 72°C), 5min 72°C (LAGUERRE et al., 2001)
	nodCI	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	
<i>nodC</i> Estudo 3	NodC540F	TGATYGAYATGGARTAYTGGCT	5min 95°C 3X (1min 95°C, 2min 15s 50°C, 1min 15s 72°C) 30X (35s 94°C, 1min 15s 50°C, 1min 15s 72°C) 7min 72°C (DE MEYER et al., 2011)
	NodC1164R	GAYARCCARTCGCTRRTTG	

4.3.3 Sequenciamento dos genes *housekeeping* e simbióticos

Nos Estudos 1 e 2, os produtos purificados resultantes das amplificações dos genes *housekeeping* e simbióticos foram sequenciados por outra reação de PCR, utilizando nucleotídeos marcados compatíveis para leitura em sequenciador ABI3500XL (Applied Biosystems). As reações foram preparadas com 2,5 µL de tampão 10x (Tris-HCl a 200 mM, KCl a 500 mM em pH 8,4), 1,3 µL de *BigDye Terminator* (Applied Biosystems), 1 µL do respectivo iniciador (3,2 pmol/ µL), 3 µL de DNA e 12,2 µL de água ultrapura esterilizada, completando o volume final de 20 µL por reação, em placas de 96 poços. O ciclo de sequenciamento foi o mesmo para todos os genes, com início a 96 °C por 1 min, seguido de 35x (96 °C por 15 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min) em termociclador (DELAMUTA et al., 2017).

Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram pelo processo de purificação. Foram adicionados 2 µL de acetato de amônio esterilizado (7,5 M) e 65 µL de etanol a 99,5 %, então as placas foram seladas, homogeneizadas e centrifugadas a 4.000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150 µL de etanol a 70 %, recém-preparado, as placas foram novamente seladas, homogeneizadas e centrifugadas a 4000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e uma centrifugação com a placa invertida em papel absorvente foi realizada a 300 rpm por 25 s para remover os resíduos. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C por 30 min para secagem (MENNA et al., 2006), em seguida foram ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95 °C por 5

min e submetidas a choque térmico em gelo por 2 min, seguindo as orientações do fabricante. Finalmente, as placas seguiram para leitura, realizada em sequenciador ABI3500XL (Applied Biosystems).

No Estudo 3 as amostras amplificadas e purificadas foram utilizadas para montar as reações de sequenciamento, de acordo com a Tabela 3, e enviadas para sequenciamento (*Sanger Sequencing*) no laboratório da *Australian Genome Research Facility* (AGRF), Perth, Austrália Ocidental.

Tabela 3: Quantidade de amostra de produto da reação de PCR purificado utilizada na reação de sequenciamento pela *Australian Genome Research Facility*.

Modelo	Quantidade da amostra purificada (volume final 12µL)
Produto do PCR 100 – 200 bp	3 - 8 ng
Produto do PCR 200 – 400 bp	6 - 12 ng
Produto do PCR 400 – 600 bp	12 - 18 ng
Produto do PCR 600 – 800 bp	18 - 30 ng
Produto do PCR >800 bp	30 - 75 ng
Quantidade do iniciador (um iniciador por reação)	10 pmol* (0,8 pmol/µl)

*Equivale a 1µL de uma solução estoque a 10µM, ou 2µL de uma solução estoque a 5µM

Fonte: Sanger Sequencing Sample Submission Guide, 2014.

Após o sequenciamento de todas as amostras (Estudos 1, 2 e 3), os *contigs* foram processados, alinhados e montados em uma sequência consenso para cada gene. Nos Estudos 1 e 2 esse processo foi realizado utilizando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.6), no Estudo 3 o programa utilizado foi o Geneious (versão 11).

4.3.4 Filogenia dos genes isolados e *MultiLocus Sequence Analysis*

Para a construção das árvores filogenéticas dos Estudos 1, 2 e 3, as sequências dos genes de interesse das estirpes de referência de espécies já descritas foram obtidas no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), a fim de analisar as informações filogenéticas dos gêneros por completo. Para as análises, as sequências foram importadas em formato FASTA para o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA, versão 7) (KUMAR; STECHER; TAMURA et al., 2016). Os alinhamentos foram realizados com o MUSCLE (EDGAR, 2004), as extremidades foram cortadas,

mantendo-se o mesmo comprimento e região (mesmo espaço de informação nucleotídica) em todas as sequências em análise. Os dendrogramas filogenéticos foram construídos no mesmo programa, o melhor modelo evolutivo utilizado em cada alinhamento foi determinado pelo MEGA considerando o menor valor do critério informativo *Bayesian Information Criterion* (BIC) (SCHWARZ, 1978). O algoritmo utilizado foi o *Maximum Likelihood* (ML) (FELSENSTEIN, 1981) com suporte estatístico avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 repetições (HEDGES, 1992).

Para a análise de MLSA, as sequências alinhadas e cortadas no mesmo tamanho dos genes *housekeeping* foram concatenadas manualmente. Primeiramente, as árvores filogenéticas dos genes isolados foram comparadas, a fim de verificar se existe uma congruência evolutiva com a filogenia do gene 16S RNAr, caso contrário, o gene não foi concatenado. Nos Estudos 1 e 3, a sequência concatenada foi montada com os genes *dnaK+glnII+gyrB+recA*, no Estudo 2 os genes concatenados foram *glnII+recA+rpoB+gyrB*. Nessa análise, o dendrograma é construído com base nas sequências concatenadas, oferecendo mais informações filogenéticas que os genes isolados. Os parâmetros utilizados na construção das árvores filogenéticas foram os mesmos para os Estudos 1, 2 e 3, seguindo como descrito acima.

Para complementar as informações das árvores filogenéticas, a Identidade Nucleotídica (IN) das sequências (genes isolados e sequências concatenadas) foi analisada utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.2).

4.3.5 Sequenciamento de genoma, *Average Nucleotide Identity* e conteúdo G+C

No Estudo 1 o genoma da estirpe selecionada como tipo foi preparado utilizando *kit* Nextera (*Nextera DNA Library Preparation*) e 20 µL do DNA total (subsessão 4.3.1) a 2,5 ng/µL, no Estudo 2 os genomas foram preparados utilizando *kit* Nextera XT (*Nextera DNA Library Preparation*) e 5 µL do DNA total a 0,2 ng/µL. Todos os genomas foram sequenciados em equipamento MiSeq (Illumina), seguindo as recomendações do fabricante. As sequências genômicas foram utilizadas para comparação com estirpes de referência de espécies relacionadas no MLSA, a fim de se obter os valores da ANI, e para calcular o conteúdo G+C das estirpes. No Estudo 1, o valor da ANI foi calculado com o programa JSpecies (RICHTER; ROSSELLÓ-

MORA, 2009) e o conteúdo G+C calculado pelo Quast (GUREVICH et al., 2013). No Estudo 2 as análises foram calculadas com o programa ANI calculator (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2016) e Quast, respectivamente.

4.3.6 *Fingerprinting*

Nos Estudos 1, 2 e 3 foi realizada uma análise do perfil genômico das estirpes por BOX-PCR. Os elementos *boxA* das estirpes foram amplificados por uma PCR utilizando o iniciador BOX A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') (KASCHUK et al., 2006). Cada reação foi preparada com 2,5 µL de tampão 10x (Tris-HCl a 200 mM, KCl a 500 mM em pH 8,4), 5,0 µL de dNTPs (1,5 mmol de cada base/L), 1,5 µL MgCl₂ (50 mmol/L), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 1,0 µL de iniciador (50 pmol/µL), 1,0 µL de DNA e 13,8 µL de água ultrapura esterilizada, completando o volume final da reação para 25 µL. O ciclo de temperaturas da reação, realizada em termociclador, teve início em 95 °C por 7 min, seguido de 30x (94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 65 °C por 8 min), uma etapa final de 65 °C por 16 min e finalização a 4 °C (HUNGRIA et al., 2008).

Após a reação, as amostras foram submetidas a gel de agarose a 1,5 %, que depois foi corado com brometo de etídio a 0,00005 % para foto-documentação do perfil das bandas. O dendrograma foi construído pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.6), utilizando-se o algoritmo *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) (SNEATH; SOKAL, 1973), e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 2 % de tolerância nos Estudos 1 e 2, e 1 % de tolerância no Estudo 3, para analisar os grupamentos.

4.3.7 Teste de nodulação e atividade do nódulo no processo de fixação de N₂

A capacidade de nodulação e atividade do nódulo no processo de fixação de N₂ foi avaliada pelo cultivo de diversas leguminosas em vasos de Leonard (VINCENT, 1970) modificados contendo como substrato areia e carvão (1:1 v/v) e manutenção com solução nutriente isenta de N (BROUGHTON; DILWORTH, 1971) sob condições esterilizadas. As sementes das plantas testadas passaram pelo processo de desinfestação de superfície como descrito no ítem 4.1, cada vaso recebeu quatro sementes, que foram inoculadas com 1,0 mL de inóculo das estirpes

a serem testadas. Aproximadamente 5 dias após a emergência duas das quatro plantas foram desbastadas, mantendo-se duas plantas por vaso durante o experimento. Os vasos permaneceram em casa de vegetação (28 - 30° C/ dia e 23 - 25° C/noite) em um período de 25 a 35 dias. A presença de nódulos efetivos (rosa) foi avaliada ao desmontar o experimento. No Estudo 1 as sementes utilizadas foram de *Deguelia costata*, *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Centrosema* spp., *Glycine max* e *Vigna subterranea* (bambara). No Estudo 2 as sementes testadas foram de *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa pudica*.

5 REFERÊNCIAS

- AN, D. S.; IM, W. T.; YANG, H. C.; LEE, S. T. *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 443-448, 2006.
- AUCH, A. F.; VON JAN, M.; KLENK, H.; GÖKER, M. 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.
- BALDWIN, I. L.; FRED, E. B. Nomenclature of the root-nodule bacteria of *Leguminosae*. **Journal of Bacteriology**, v. 17, p. 141-150, 1929.
- BARAL, B.; SILVA, J. A. T.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 1-13, 2016.
- BASI, S.; NEUMANN, M.; MARAFON, F.; UENO, R. K.; SANDINI, I. E. Influência da adubação nitrogenada sobre a qualidade da silagem de milho. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 4, n. 3, p. 219-226, 2011.
- BAUER, A. W.; KIRBY, E. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BEJARANO, A.; RAMÍREZ-BAHENAA, M.; VELÁZQUEZB, E.; PEIX, A. *Vigna unguiculata* is nodulated in Spain by endosymbionts of *Genisteeae* legumes and by a new symbiovar (vignae) of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, p. 533-540, 2014.
- BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 6, p. 616-639, 2014.
- BOODY, G.; DEVORE, B. Redesigning agriculture. **BioScience**, v. 56, n. 10, p. 839-845, 2006.
- BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. **Biochemical Journal**, v. 125, n. 4, p. 1075-1080, 1971.
- CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 5631-5642, 2014.
- CASIDA Jr., L. E. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, p. 339-345, 1982.
- CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 392-397, 1988.

CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 316-324, 2014.

CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; COSTA, M. S.; ROONEY, A. P.; YI, H.; DE MEYER, S.; TRUJILLO, M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 461-466, 2018.

CONN, H. J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 44, p. 353-360, 1942.

CORDEIRO, A. B.; RIBEIRO, R. A.; HELENE, L. C. F.; HUNGRIA, M. *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 3937-3945, 2017.

DAI, J.; LIU, X.; FANG, Y. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from *Caragana microphylla* growing in desert soil in Ningxia, China. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2683-2693, 2012.

DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C.; FARIA, S. M.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, 2017.

DE MEYER, S. E.; VAN HOORDE, K.; VEKEMAN, B.; BRAECKMAN, T.; WILLEMS, A. Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 2384-2396, 2011.

DE VOS, P. Multilocus sequence determination and analysis. In: RAINEY, F.; OREN, A. (Ed.) **Taxonomy of Prokaryotes**. San Diego: Elsevier Science, 2012. p. 385-407.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; GOMES, D.; F.SOUZA, R. C.; CHUEIRE, L. M. O.; HUNGRIA, M. Genome sequence of *Bradyrhizobium stylosanthis* strain BR 446^T, a nitrogen-fixing symbiont of the legume pasture *Stylosanthes guianensis*. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, 2016.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; HUNGRIA, M. Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, p. 254-265, 2017.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MELO, I. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342-3351, 2013.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 89-98, 1988.

DURÁN, D.; REY, L.; MAYO, J.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ORMEÑO-ORRILLO, E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2072-2078, 2014.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; VAN LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MULLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. B.; MAZUMDAR, R. M.; CHOWDHURY, A.; HOSSAIN, M. N. Identification and characterization of microorganisms: DNA-fingerprinting methods. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 35 n. 4, p. 397-404, 2013.

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

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, p. 368-376, 1981.

FRANK, B. Über die pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 7, p. 332-346, 1889.

FUNDAÇÃO AGRISUS. **Fundação Agrisus**: agricultura sustentável. 2017. Disponível em: <<http://agrisus.org.br/noticias.asp?cod=1755>>. Acesso em 28 dez. 2018.

GALLOWAY, J. N.; DENTENER, F. J.; CAPONE, D. G.; BOYER, E. W.; HOWARTH, R. W.; SEITZINGER, S. P.; ASNER, G. P.; CLEVELAND, C. C.; GREEN, P. A.; HOLLAND, E. A.; KARL, D. M.; MICHAELS, A. F.; PORTER, J. H.; TOWNSEND, A. R.; VÖOSMARTY, C. J. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, v. 70, n. 2, p. 153-226, 2004.

GERDING, M.; O'HARA, G. W.; HOWIESON, J. G.; BRÄU, L. Overcoming non-selective nodulation of *Lessertia* by soil-borne rhizobium in the presence of inoculant mesorhizobium. **Plant and Soil**, v. 380, n. 1, p. 117-132, 2014.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.;

- THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.
- GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. 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.; ROSAS, J. C.; ESTEVEZ DE JENSEN, C.; PERALTA, E.; TLUSTY, B.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; ARRAES PEREIRA, P. A. Addressing edaphic constraints to bean production: the bean/cowpea CRSP project in perspective. **Field Crops Research**, v. 82, n. 2-3, p. 179-192, 2003.
- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, p. 1072-1075, 2013.
- HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy**. 4. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2011. 282 p.
- HEDGES, S. B. The number of replications needed for accurate estimation of the *bootstrap* p-value in phylogenetic studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 366-369, 1992.
- HELENE, L. C. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 1827-1834, 2017a.
- HELENE, L. C. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 4441-4448, 2015a.
- HELENE, L. C. F.; GOMES, D. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, R. C.; ALMEIDA, L. G. P.; VASCONCELOS, A. T. R.; HUNGRIA, M. Genome sequence of *Bradyrhizobium viridifuturi* strain SEMIA 690^T, a nitrogen-fixing symbiont of *Centrosema pubescens*. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, 2015b.
- HELENE, L. C. F.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Genome sequence of *Rhizobium esperanzae* type strain CNPSo 668, isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Mexico. **Genome Announcements**, v. 5, n. 35, 2017b.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.
- HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z. Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 4041-4062, 2014.
- HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN, M.; KERSTERS, K. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 406-416, 1988.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. **Working with rhizobia**. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016. 312 p.

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. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79).

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**. v.2. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p.1005-1019.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p. 9-89.

ICSP. Statutes of the International Committee on Systematic Bacteriology of the International Union of Microbiological Societies. Article 9, Organization and Functions of Subcommittees on Taxonomy. In: LAPAGE, S. P.; SNEATH, P. H. A.; LESSEL, E. F.; SKERMAN, V. B. D.; SEELIGER, H. P. R.; CLARK, W. A. International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). **American Society for Microbiology**, p. 152-155, 1992. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-minimalstandards.html>> Acesso em: 19 dez. 2018.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v. 11, p. 37-50, 1912.

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47 n. 3, p. 895-898, 1997.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.

KÄMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 291-317, 2012.

KANSO, S.; PATEL, B. K. C. *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 401-406, 2003.

- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, p. 210-220, 2006.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR P. A.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] dependent on N₂ fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, v. 12, p. 60–69, 2010.
- KASCHUK, G.; KUYPER, T. W.; LEFFELAAR, P. A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 1233-1244, 2009.
- KIM, M.; OH, H.; PARK, S.; CHUN, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 346–351, 2014.
- KLENK, H. P.; GOKER, M. En route to a genome-based classification of *Archea* and *Bacteria*? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 175–182, 2010.
- KNÖSEL, D. H. Genus *Phyllobacterium*. In: KRIEG N. R.; HOLT, J. G (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984, p. 254-256.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance 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.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7286-7293, 2006.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1879, 2016.
- LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001.
- DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1277-1290, 1998.
- LARANJO, M.; YOUNG, J. P. F.; OLIVEIRA, S. Multilocus Sequence Analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 359-367, 2012.

- LIMPENS, E.; MIRABELLA, R.; FEDOROVA, E.; FRANKEN, C.; FRANSSEN, H.; BISSELING, T.; GEURTS, R. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 10375-10380, 2005.
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- MAKKAR, N. S.; CASIDA Jr., L. E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 323-326, 1987.
- MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 57, p. 489-503, 2007.
- MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; HIRSCH, A. M. The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. **Phytobiomes**, v. 1, p. 70-82, 2017.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-426, 1991.
- MCNEILL, A.; UNKOVICH, M. The nitrogen cycle in terrestrial ecosystems. In: MARSCHNER, P.; RENGEL, Z. (Ed.) **Nutrient cycling in terrestrial ecosystems**. Berlin: Springer, 2007. p. 37-64.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H.; GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **Bio Med Central Bioinformatics**, v. 14, n. 60, p. 1-14, 2013.
- 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.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p.3 15-32, 2006.
- MESBAH, N. M.; WHITMAN, W. B.; MESBAH, M. Determination of the G+C Content of Prokaryotes. In: RAINEY, F.; OREN, A. (Ed.) **Taxonomy of Prokaryotes**. 1. ed. San Diego: Elsevier Science, 2012. p. 299-324.
- MOHAMAD, R.; WILLEMS, A.; LE QUÉRÉ, A.; MAYNAUD, G.; PERVENT, M.; BONABAUD, M.; DUBOIS, E.; CLEYET-MAREL, J.; BRUNEL, B. *Mesorhizobium delmotii* and *Mesorhizobium prunedense* are two new species containing rhizobial strains within the symbiovar anthyllidis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 135-143, 2017.

- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.
- MOUSAVI, S. A.; ÖSTERMAN, J.; WAHLBERG, N.; NESME, X.; LAVIRE, C.; VIAL, L.; PAULIN, L.; DE LAJUDIE, P.; LINDSTRÖM, K.. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, p. 208-215, 2014.
- MOUSAVI, S. A.; WILLEMS, A.; NESME, X.; DE LAJUDIE, P.; LINDSTRÖM, K. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 84-90, 2015.
- NAKAGAWA, Y.; SAKANE, T.; YOKOTA, A. Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*" (Foster 1944), a Gram-negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 16-22, 1996.
- NÖRTEMANN, B. Total degradation of EDTA by mixed cultures and a bacterial isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 671-676, 1992.
- OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252-263, 2013.
- 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.
- OTT, T.; VAN DONGEN, J. T.; GÜNTHER, C.; KRUSELL, L.; DESBROSSES, G.; VIGEOLAS, H.; BOCK, V.; CZECHOWSKI, T.; GEIGENBERGER, P.; UDVARDI, M. K.. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. **Current Biology**, v. 15, p. 531-535, 2005.
- OVCHINNIKOVA, E.; JOURNET, E.; CHABAUD, M.; COSSON, V.; RATET, P.; DUC, G.; FEDOROVA, E.; LIU, W.; CAMP, R. O.; ZHUKOV, V.; TIKHONOVICH, I.; BORISOV, A.; BISSELING, T.; LIMPENS, E. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1333-1344, 2011.
- PANDYA, M.; KUMAR, G. N.; RAJKUMAR, S. Invasion of rhizobial infection thread by non rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. **FEMS Microbiology Letters**, v. 348, p. 58-65, 2013.
- PATT, T. E.; COLE, G. C.; HANSON, R. S. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, p. 226-229, 1976.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, p. 17-42, 2015.

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

PORTAL EMBRAPA. **Sobre o tema – Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>> Acesso em 18 fevereiro 2019.

RAMOS, P. L.; MOREIRA-FILHO, C. A.; TRAPPEN S. V.; SWINGS, J.; VOS, P.; BARBOSA, H. R.; THOMPSON, C. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; THOMPSON, F. L. 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.

RIBEIRO, C. W.; ALLOING, G.; MANDON, K.; FRENDO, P. Redox regulation of differentiation in symbiotic nitrogen fixation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, p. 1469–1478, 2015.

RIBEIRO, R. A.; HELENE, L. C. F.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M. Genome sequence of *Bradyrhizobium mercantei* strain SEMIA 6399^T, Isolated from nodules of *Dequelia costata* in Brazil. **Genome Announcements**, v. 5, n. 36, 2017.

RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R. F.; GRAHAM, P. H.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. 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.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. 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.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MORA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 19126-19131, 2009.

RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. **PeerJ Preprints**, 2016.

ROGEL, M.A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTINEZ ROMERO, E. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 96-104, 2011.

RONG, F.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 7-18, 2012.

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

ROSSELLÓ-MÓRA, R.; URDIAIN, M.; LÓPEZ-LÓPEZ, A. DNA-DNA Hybridization. In: RAINEY, F.; OREN, A. **Taxonomy of Prokaryotes**. San Diego: Elsevier Science, 2012. p. 325-347.

SANGER SEQUENCING SAMPLE SUBMISSION GUIDE. **Australian Genome Research Facility (AGRF)**. 2014. Disponível em: <<http://www.agrf.org.au/>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A Formação do nódulo em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 36 p. (Embrapa. Documentos, 251).

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. MIDI - Technical Note, n. 101, 1990.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 1-22, 2014.

SCHLEIFER, K. H. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 533-542, 2009.

SCHULZ, S.; BRANKATSCHK, R.; DÜMIG, A.; KÖGEL-KNABNER, I.; SCHLOTTER, M.; ZEYER, J. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. **Biogeosciences**, v. 10, n. 6, p. 3983-3996, 2013.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **The Annals of Statistics**, v. 6 n. 2, p. 461-464, 1978.

SNEATH, P. H. A. Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 626-629, 1993.

SNEATH, P. H. A. **International code of nomenclature of Bacteria (1900 revision)**. Washington: American Society for Microbiology, 1992.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. 573 p.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology**. New York, United States: Springer-Verlag, 1994. 450 p.

SPRENT, J. I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **The New Phytologist**, v. 174, n. 1, p. 11-25, 2007.

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

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in

bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. 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.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYZANSKA, A.; MCINNES, A.; LAW, I. J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7041-7052, 2005.

SUTCLIFFE, I. C.; TRUJILLO, M. E.; GOODFELLOW, M. A call to arms for systematists: revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 13-20, 2012.

THOMPSON, C. C.; CHIMETTO, L.; EDWARDS, R. A.; SWINGS, J.; STACKEBRANDT, E. THOMPSON, F. L. Microbial genomic taxonomy. **BMC Genomics**, v. 14, 913 p., 2013.

THOMPSON, F. L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C. C.; DAWYNDDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C. B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of Multilocus Sequence Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5107-5115, 2005.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.

URAKAMI, T.; ARAKI, H.; OYANAGI, H.; SUZUKI, K. I.; KOMAGATA, K. Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans* comb. nov. and description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 84-92, 1992.

VANCANNEYT, M.; MENGAUD, J.; CLEENWERCK, I.; VANHONACKER, K.; HOSTE, B.; DAWYNDDT, P.; DEGIVRY, M. C.; RINGUET, D.; JANSSENS, D.; SWINGS, J. Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa *et al.* 1994 as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa *et al.* 1988. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 551-556, 2004.

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

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

- VELÁZQUEZ, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; RIVAS, R.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: ZAIDI, A.; KHAN, M.; MUSARRAT, J. (Ed.) **Microbes for legume improvement**. Switzerland: Springer, 2017.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).
- VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITE, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. 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, p. 702–716, 2005.
- WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.
- WOESE, C. R.; STACKEBRANDT, E.; WEISBURG, W. G.; PASTER, B. J.; MADIGAN, M. T.; FOWLER, V. J.; HAHN, C. M.; BLANZ, P.; GUPTA, R.; NEALSON, K. H.; FOX, G. E. The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 5, p. 315-326, 1984.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.
- 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.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology Immunology**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.
- YATES, R. J.; HOWIESON, J. G.; REEVE, W. G.; O'HARA, G. W. A re-appraisal of the biology and terminology describing rhizobial strain success in nodule occupancy of legumes in agriculture. **Plant and Soil**, v. 348, n. 1-2, p. 255-267, 2011.
- YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer Casida* 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a

later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2107-2110, 2003.

YOUNG, I. M; CRAWFORD, J. W. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. **Science**, v. 304, p. 1634–1637, 2004.

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

ZHANG, W.; DU, P.; ZHENG, H.; YU, W.; WAN, L.; CHEN, C. Whole-genome sequence comparison as a method for improving bacterial species definition. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, p. 75–78, 2014.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of Theoretical Biology**, v. 8, p. 357-366, 1965.

6 ESTUDO 1

Bradyrhizobium mercantei sp. nov., simbiote fixador de nitrogênio isolado de nódulos de *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*).

Algumas bactérias conhecidas coletivamente como rizóbios podem estabelecer relações simbióticas e fixar nitrogênio atmosférico com várias leguminosas utilizadas como adubos verde, pastagens e para a produção de madeira. Simbiontes do gênero *Bradyrhizobium* são predominantes nos trópicos, e um grande número de estudos reporta alta diversidade genética dentro do gênero. Foi realizado um estudo polifásico com duas estirpes do gênero *Bradyrhizobium* – SEMIA 6399^T e SEMIA 6404 – isoladas de nódulos de *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*), uma importante leguminosa nativa do leste do Brasil. Em geral, sequências do gene 16S RNAr são altamente conservadas nos membros do gênero *Bradyrhizobium*, e as duas estirpes foram posicionadas no superclado da espécie *Bradyrhizobium elkanii*, compartilhando 100 % de identidade nucleotídica com *Bradyrhizobium embrapense*, *Bradyrhizobium erythrophlei* e *Bradyrhizobium viridifuturi*. Entretanto, a *MultiLocus Sequence Analysis* com quatro genes conservados (*housekeeping*) (*dnaK*, *glnII*, *gyrB* e *recA*) confirmou que as duas estirpes pertencem a um grupo distinto, compartilhando de 87,7 a 96,1 % de identidade nucleotídica com as espécies relacionadas do gênero *Bradyrhizobium*, estando mais próximas da espécie *B. viridifuturi*. A identidade média de nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity*, ANI) das sequências genômicas entre a estirpe SEMIA 6399^T e as espécies relacionadas foi inferior a 92 %, abaixo do limite de delineamento de espécies. A filogenia do gene *nifH* agrupou as estirpes em estudo em um grupo distinto das outras espécies do gênero *Bradyrhizobium*, e a filogenia do gene *nodD* revelou que a SEMIA 6399^T apresenta a sequência de maior divergência. Outras características fenotípicas e genotípicas foram determinadas para o novo grupo, e os dados suportam a descrição das estirpes em estudo como representantes da nova espécie *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov.; SEMIA 6399^T (=CNPSO 1165^T =BR 6010^T =U675^T =LMG 30031^T) foi escolhida como estirpe tipo.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*; filogenia de procariotos; fixação biológica do nitrogênio; MLSA; ANI; IN.

HELENE, L. C. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 1827-1834, 2017. DOI: 10.1099/ijsem.0.001870.

Bradyrhizobium mercantei sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*)

Luisa Caroline Ferraz Helene,^{1,2,3} Jakeline Renata Marçon Delamuta,^{1,3} Renan Augusto Ribeiro⁴ and Mariangela Hungria^{1,2,4,*}

Abstract

Some bacteria collectively known as rhizobia can establish symbiotic relationships and the N₂-fixation process with several legumes used as green manure, in pastures and for wood production. Symbionts belonging to the genus *Bradyrhizobium* are predominant in the tropics, and an increasing number of studies report high genetic diversity within the genus. We performed a polyphasic study with two strains belonging to the genus *Bradyrhizobium*—SEMIA 6399^T and SEMIA 6404—isolated from root nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*), an important legume native to eastern Brazil. In general, sequences of the 16S rRNA gene were highly conserved in members of the genus *Bradyrhizobium*, and the two strains were positioned in the *Bradyrhizobium elkanii* superclade, sharing 100% nucleotide identity with *Bradyrhizobium embrapense*, *Bradyrhizobium erythrophlei* and *Bradyrhizobium viridifuturi*. However, multilocus sequence analysis with four housekeeping genes (*dnaK*, *glnII*, *gyrB* and *recA*) confirmed that the two strains belong to a distinct clade, sharing from 87.7 to 96.1% nucleotide identity with related species of the genus *Bradyrhizobium*, being most closely related to *B. viridifuturi*. Average nucleotide identity of genome sequences between SEMIA 6399^T and related species was lower than 92%, below the threshold of species circumscription. *nifH* phylogeny clustered the SEMIA strains in a clade separated from other species of the genus *Bradyrhizobium*, and the *nodD* phylogeny revealed that SEMIA 6399^T presents a more divergent sequence. Other phenotypic and genotypic traits were determined for the new group, and our data support the description of the SEMIA strains as representatives of *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov.; SEMIA 6399^T (=CNPSo 1165^T=BR 6010^T=U675^T=LMG 30031^T) was chosen as the type strain.

Among the processes performed by soil-borne prokaryotes, nitrogen fixation by diazotrophic bacteria is one of the most important, responsible for the biological conversion of atmospheric nitrogen (N₂) into nitrogenous compounds that plants can assimilate, contributing to the balance of nutrients and energy in agriculture and to the improvement of soil fertility. The symbioses between rhizobia and leguminous plants provide the highest in contribution, supplying N for important grain crops, as well as for other legumes used as green manure, pastures and for wood production, etc. [1, 2]. Diazotrophic bacteria belonging to the genus *Bradyrhizobium* [3] are predominant in rhizobial populations in tropical soils, and an increasing number of

phylogenetic studies report high genetic diversity within the genus [4–13]. It is noteworthy that species of the genus *Bradyrhizobium* are not only highly diverse, but are also representative of symbionts across the whole diversity of nodulating legumes [13], including basal legumes in the subfamily Caesalpinioideae, and, hence, are the most likely candidates for being primordial legume symbionts [14]. The analysis of the 16S rRNA gene sequence still represents the backbone of taxonomic studies, but in some genera, such as the genus *Bradyrhizobium*, this gene is highly conserved and a poor candidate for defining species (e.g. [4, 15, 16]). Therefore, other approaches such as multilocus sequence analysis (MLSA) and average nucleotide identity

Author affiliations: ¹Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil; ²Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, 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, 70.040-020 Brasília, Distrito Federal, Brazil; ⁴Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, SHIS QI 1 Conjunto B, Blocos A, B, C e D, Lago Sul, 71605-001 Brasília, Distrito Federal, Brazil.

***Correspondence:** Mariangela Hungria, mariangela.hungria@embrapa.br or biotecnologia.solo@hotmail.com or hungria@cnpq.br

Keywords: *Bradyrhizobium*; phylogeny of prokaryotes; biological nitrogen fixation; MLSA; ANI; NI.

Abbreviations: ANI, average nucleotide identity; DDH, DNA-DNA hybridization; MLSA, multilocus sequence analysis.

The following new sequences have been deposited in GenBank/EMBL/DBJ: *dnaK* of *B. mercantei* SEMIA 6399^T (acc. no. KX690617), SEMIA 6404 (KX690618), *B. ferriligni* CCBAU 51502^T (KX690619), *B. erythrophlei* CCBAU 53325^T (KX690620); *glnII* of *B. mercantei* SEMIA 6399^T (KX690621), SEMIA 6404 (KX690622); *gyrB* of *B. mercantei* SEMIA 6399^T (KX690623), SEMIA 6404 (KX690624); *recA* of *B. mercantei* SEMIA 6399^T (KX690615), SEMIA 6404 (KX690616); *nifH* of *B. mercantei* SEMIA 6399^T (KX690625), SEMIA 6404 (KX690626); genome sequence of SEMIA 6399^T (MKFI00000000).

Six supplementary figures and four supplementary tables are available with the online Supplementary Material.

(ANI) have proven to be successful and are being increasingly adopted for the definition of novel species of the genus *Bradyrhizobium* [7–9, 12, 17, 18, 19]. Besides, in order to clarify the evolution of rhizobial symbiosis, studies of nodulation and nitrogen-fixation genes have also been conducted in species of the genus *Bradyrhizobium* [6, 20–22].

Strains belonging to the genus *Bradyrhizobium* used in this study are listed in Table S1 (available in the online Supplementary Material). The two strains representing the novel species, SEMIA 6399^T and SEMIA 6404, were isolated from nodules of *Deguelia costata* (Benth.) A.M.G. Azevedo and R.A. Camargo (syn. *Lonchocarpus costatus* Benth.) in southeast Brazil, by Dr Sergio Miana de Faria [23, 24]. They are very effective in fixing nitrogen with *D. costata*, and as such have been used in commercial inoculants for *Deguelia* since 1994. This legume is originally from eastern Brazil and is grown mainly for wood production. The strains have been deposited at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja (WFCC Collection no. 1213, WDCM Collection no. 1054), located at Londrina, State of Paraná, Brazil, and in other culture collections. Strains were grown on modified yeast extract-mannitol agar (YMA) medium [25] at 28 °C, unless otherwise indicated. The stock cultures were maintained on YMA modified medium at 4 °C, while long-term preservation was achieved in liquid YM modified medium containing 30 % glycerol (v/v) at –80 and –150 °C, or by lyophilization.

The 16S rRNA gene sequence and partial sequences of the *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* and *nifH* genes were obtained by PCR using the primers and conditions described by Delamuta *et al.* [7] and were sequenced in an ABI3500xL analyzer (Applied Biosystems), while other sequences representing members of the genus *Bradyrhizobium* used in this study were retrieved from the GenBank database; *nodD* sequences were retrieved from genomes available in the GenBank database. Accession numbers are shown in the phylograms or in Table S2. Maximum-likelihood (ML) phylogenies were obtained with MEGA 6 [26] using the Tamura–Nei model [27], and multiple sequence alignments were constructed with MUSCLE [28]. Tree node support was evaluated with bootstrap analysis [29] using 1000 pseudoreplicates.

The phylogenetic tree built on the basis of the 16S rRNA gene sequences split all strains into two superclades, one with *Bradyrhizobium japonicum* and the other with *Bradyrhizobium elkanii* (Fig. 1). Both SEMIA strains were clustered in the *B. elkanii* superclade, showing higher similarity with the species *Bradyrhizobium viridifuturi*, *Bradyrhizobium erythrophlei*, *Bradyrhizobium embrapense* and *Bradyrhizobium jicamae*. As commented before and confirmed in our study, the 16S rRNA gene sequences are very conserved and unable to define species within the genus *Bradyrhizobium* [4, 7–9, 16, 30].

Four housekeeping genes were sequenced, and the accession numbers are shown in Table S2. In three out of the four

phylogenetic trees, with *glnII*, *gyrB* and *recA* genes (Figs S1, S2 and S3), the SEMIA strains were clustered with bootstrap values greater than 98 % and isolated from other type strains. The bootstrap support was lower in the *dnaK* phylogeny (Fig. S4), but again, the SEMIA strains were not clustered with any species of the genus *Bradyrhizobium*. The MLSA phylogenetic tree was built with the concatenated partial sequences of the *dnaK*, *glnII*, *gyrB* and *recA* genes, and the phylogenetic tree confirmed the two superclades, with both SEMIA strains grouping in the *B. elkanii* superclade (Fig. 2). SEMIA 6399^T and SEMIA 6404 formed a consistent group with 100 % bootstrap support and were separated from the other species of the genus *Bradyrhizobium*. The closest phylogenetic neighbours of the SEMIA strains were *Bradyrhizobium tropiciagri*, *B. viridifuturi* and *Bradyrhizobium ferriligni*. Therefore, our results confirm the feasibility of using the MLSA approach to define new phylogenetic groups within the genus *Bradyrhizobium* [8, 9, 12, 17, 18, 19, 31, 32, 33] and support that SEMIA 6399^T and SEMIA 6404 represent a novel species.

Nucleotide identities of the 16S rRNA gene and of isolated and concatenated housekeeping genes are shown in Table S3. The SEMIA strains shared 100 % sequence similarity vis-à-vis the 16S rRNA gene, and 99 % sequence similarity of the concatenated sequences of the four housekeeping genes. In the comparison of SEMIA strains with closely related species of the genus *Bradyrhizobium*, sequence similarity values ranged from 96.4 to 100 % among the 16S rRNA genes, and from 87.7 to 96.1 % for the concatenated sequences, being higher with *B. viridifuturi*. Within the genus *Bradyrhizobium*, the value suggested as a cut-off level for species definition has been 97 % for concatenated sequences [17], which also supports the classification of the SEMIA strains as a new group.

The use of ANI to estimate genome relatedness is also being increasingly used in rhizobial taxonomy and accepted to describe novel species, replacing DNA–DNA hybridization (DDH) [8, 9, 12, 18]. A draft genome sequence of SEMIA 6399^T was obtained in our study (accession no. MKFI00000000), and the genome sequences of closely related species of the genus *Bradyrhizobium* [*B. tropiciagri* (LFLZ00000000.1), *B. viridifuturi* (LGTB00000000.1), *B. elkanii* (ARAG00000000.1), *Bradyrhizobium pachyrhizi* (LFIQ00000000) and *B. embrapense* (LFIP00000000.2)] were retrieved from GenBank. ANI was calculated with JSpecies [34] and Mummer for sequence alignment. The DDH value considered as the standard for prokaryotic species distinction is 70 %, and should correspond to ANI values of 95–96 % [34], a range that was confirmed by Kim *et al.* [35] in the analyses of 6787 genomes. All ANI values found in our study were below this threshold, with the highest values of 91.5 % with *B. tropiciagri* and 91.4 % with *B. viridifuturi* (Table 1), supporting that the SEMIA strains represent a novel species.

To determine the DNA G+C content, the genome contigs were concatenated and the proportion of G+C bases was calculated with Quast [36]. SEMIA 6399^T had a DNA G+C

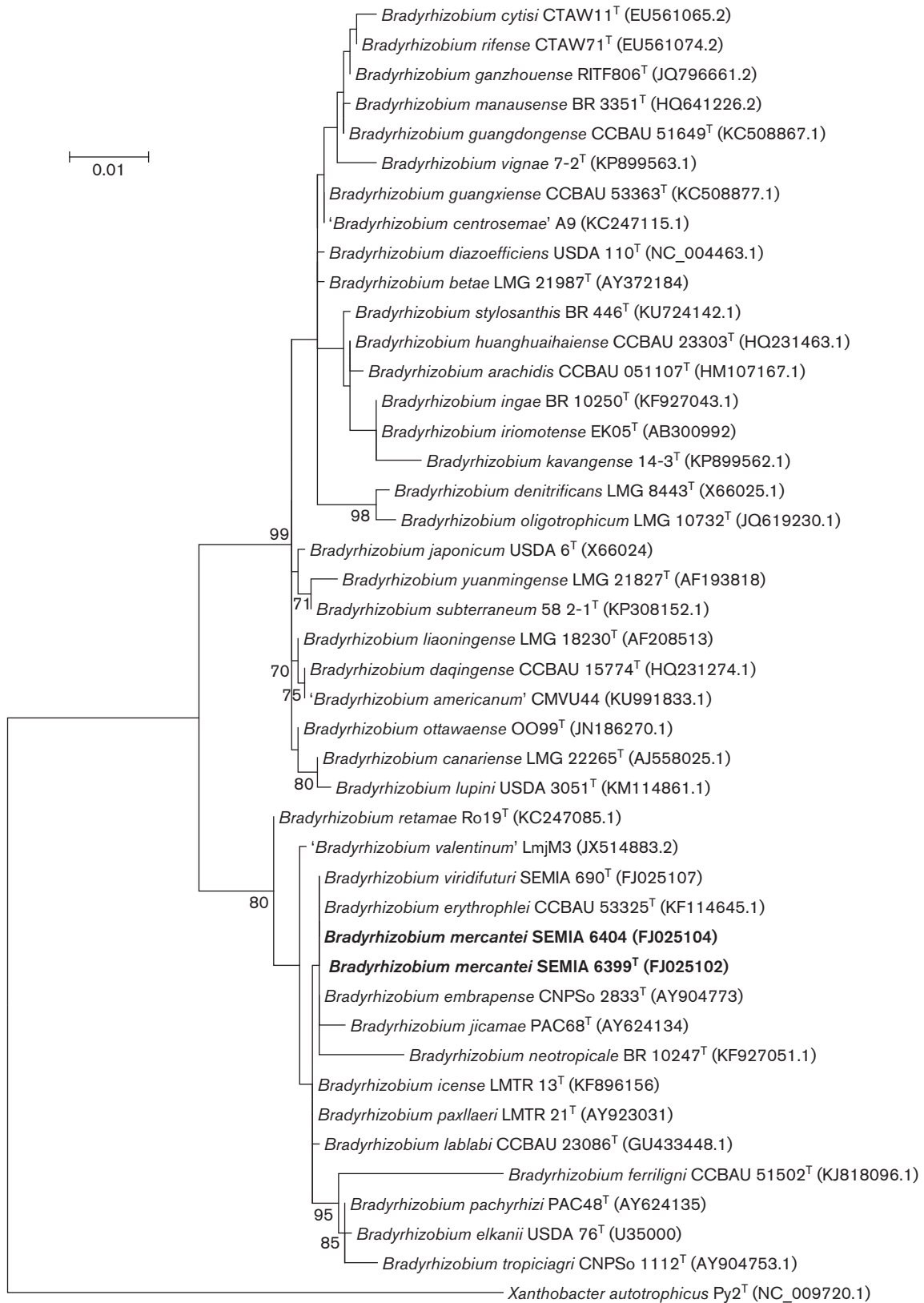


Fig. 1. Maximum-likelihood phylogeny based on the 16S rRNA gene sequences. Accession numbers are indicated within parentheses. Strains of the novel species are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

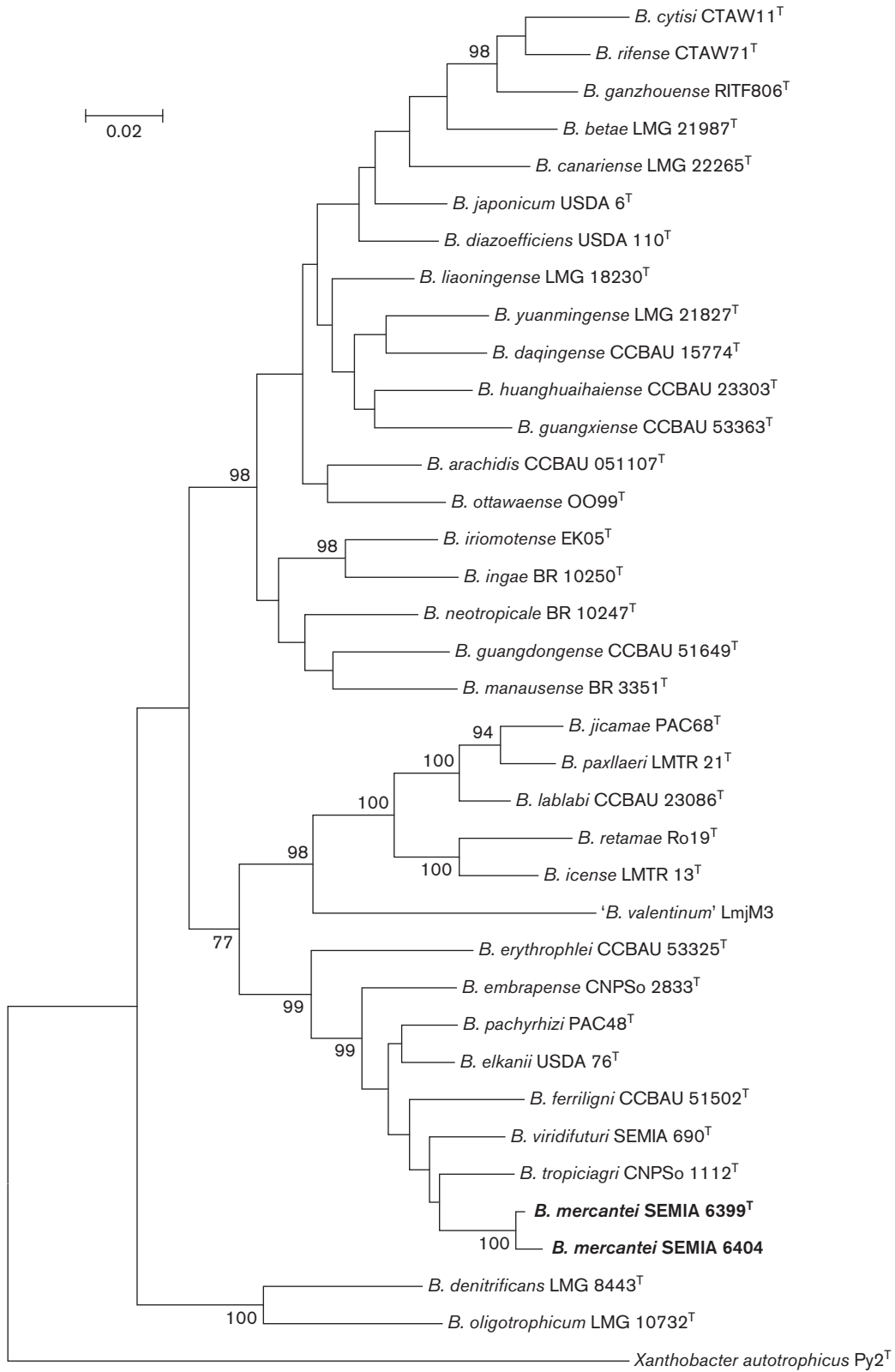


Fig. 2. Maximum-likelihood phylogeny based on the concatenated *dnaK*, *glnI*, *gyrB* and *recA* gene sequences showing the relationships between strains of the novel species (in bold type) and other members of the genus *Bradyrhizobium*. Accession numbers are indicated in Table S2. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

Table 1. ANI values (percentages) between *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov. SEMIA 6399^T and the type strains of the most closely related species of the genus *Bradyrhizobium*

Strain used as reference	SEMIA 6399 ^T
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76 ^T	90.9
<i>Bradyrhizobium embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	90.7
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	90.9
<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	91.5
<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	91.4

content of 63.99 mol%, which is within the range for species of the genus *Bradyrhizobium* [37].

A genomic fingerprint using a BOX-A1R primer was also generated [38], and the profiles were compared with those of seven phylogenetically closely related species based on MLSA. The clusters were generated using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) algorithm [39] and the Jaccard coefficient [40], with 2 % tolerance, with the Bionumerics program (Applied Mathematics). In the BOX dendrogram (Fig. S5), the two SEMIA strains clustered with 100 % similarity and with less than 62 % similarity with *B. tropiciagri*, the closest species.

The fatty acid profile of strain SEMIA 6399^T was determined using the MIDI Sherlock Microbial Identification System with the TSBA6 database after growth on YMA for 7 days, as described previously [7]. The analyses revealed summed feature 8 ($C_{18:1\omega6c}/C_{18:1\omega7c}$) as the major fatty acid in SEMIA 6399^T (Table S4), present in a typical proportion seen in members of the genus *Bradyrhizobium* [41].

Since a main feature of the SEMIA strains is their capacity for fixing nitrogen, the *nifH* gene was sequenced as described by Menna and Hungria [20] and the *nodD* gene sequence of SEMIA 6399^T was retrieved from the genome (MKFI00000000). The sequences of other species of the genus *Bradyrhizobium* were retrieved from the GenBank database to build phylograms of *nifH* (Fig. 3) and *nodD* (Fig. S6) genes. In the phylogenetic tree of *nifH*, the SEMIA strains were clustered with 99 % bootstrap support, isolated from the other type strains of related species of the genus *Bradyrhizobium*, and the highest similarity was observed with *B. erythrophlei* (Fig. 3). In the analysis of the *nodD* gene, strain SEMIA 6399^T presented a more divergent sequence, occupying an isolated position in the tree (Fig. S6).

We also evaluated the nodulation and nitrogen-fixation abilities of SEMIA strains with different host legumes. Evaluation was performed in modified Leonard jars containing sand and vermiculite and receiving nutrient solution without nitrogen, under sterile conditions. The presence of effective pink nodules with both strains was confirmed in *Deguelia costata* and in siratro (*Macroptilium atropurpureum*). SEMIA 6404, but not SEMIA 6399^T, formed pink nodules with *Centrosema* spp. Neither strain was able to

nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*), soybean (*Glycine max*) or bambara groundnut (*Vigna subterranea*).

Phenotypic characteristics were evaluated for the SEMIA strains and closely related species of the genus *Bradyrhizobium*. Unless indicated, phenotypic tests were performed at 28 °C, evaluating colony morphology, ability to grow on YMA medium with 1 % NaCl, acid/alkaline reaction on YMA medium with bromothymol blue, and ability to grow on liquid YM medium at pH 4.5 and pH 8.0, at 28, 37 and 40 °C, and in liquid Luria–Bertani (LB) medium, all conducted as previously described [42]. Enzymic degradation of urea was determined in YMA medium containing 2 % urea and phenol red as indicator. The utilization of carbon sources was evaluated with the API 50CH kit (BioMérieux), following the manufacturer's recommendations, and the basal medium used was YM-minus-mannitol, with bromothymol blue as indicator of acid or alkali reaction when using each C source. Resistance to 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), nalidixic acid (30 µg), neomycin (30 µg), penicillin (10 U), tetracycline (30 µg), streptomycin (10 µg) and erythromycin (15 µg). All tests were performed in duplicate. Only the results that were different among the SEMIA strains, or that were different among the species, are shown in Table 2, and the main differences are included in the species description. For the intrinsic resistance to antibiotics, the results are included only in the species description.

In conclusion, after this extensive polyphasic study involving phenotypic, genotypic and phylogenetic analyses, the results indicate that SEMIA 6399^T and SEMIA 6404 represent a novel species within the genus *Bradyrhizobium*, for which the name *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov. is proposed, with SEMIA 6399^T nominated as the type strain.

DESCRIPTION OF *BRADYRHIZOBIUM MERCANTEI* SP. NOV.

Bradyrhizobium mercantei [mer.can'te.i. N.L. masc. gen. n. *mercantei* of Mercante, named after Dr Fábio Martins Mercante (1963–2016), an enthusiastic Brazilian microbiologist who made a remarkable contribution to biological nitrogen fixation technology].

Cells are Gram-stain-negative, aerobic, non-spore-forming rods. Colonies on YMA medium are oval and translucent, with low production of mucus, and less than 1 mm in diameter within 7 days of incubation at 28 °C. Alkalinizes YMA medium with bromothymol blue in 7 days, and optimum growth occurs at pH 6.8 and 28 °C. Does not grow in LB medium, in the presence of 1 % NaCl or at 37 °C or above, but grows at pH 4.5 and 8.0. Positive for urease activity. Shows intrinsic resistance to bacitracin, penicillin, cefuroxime, ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, nalidixic acid, tetracycline and streptomycin, and shows moderate growth or is resistant to neomycin. With respect to carbon sources in the

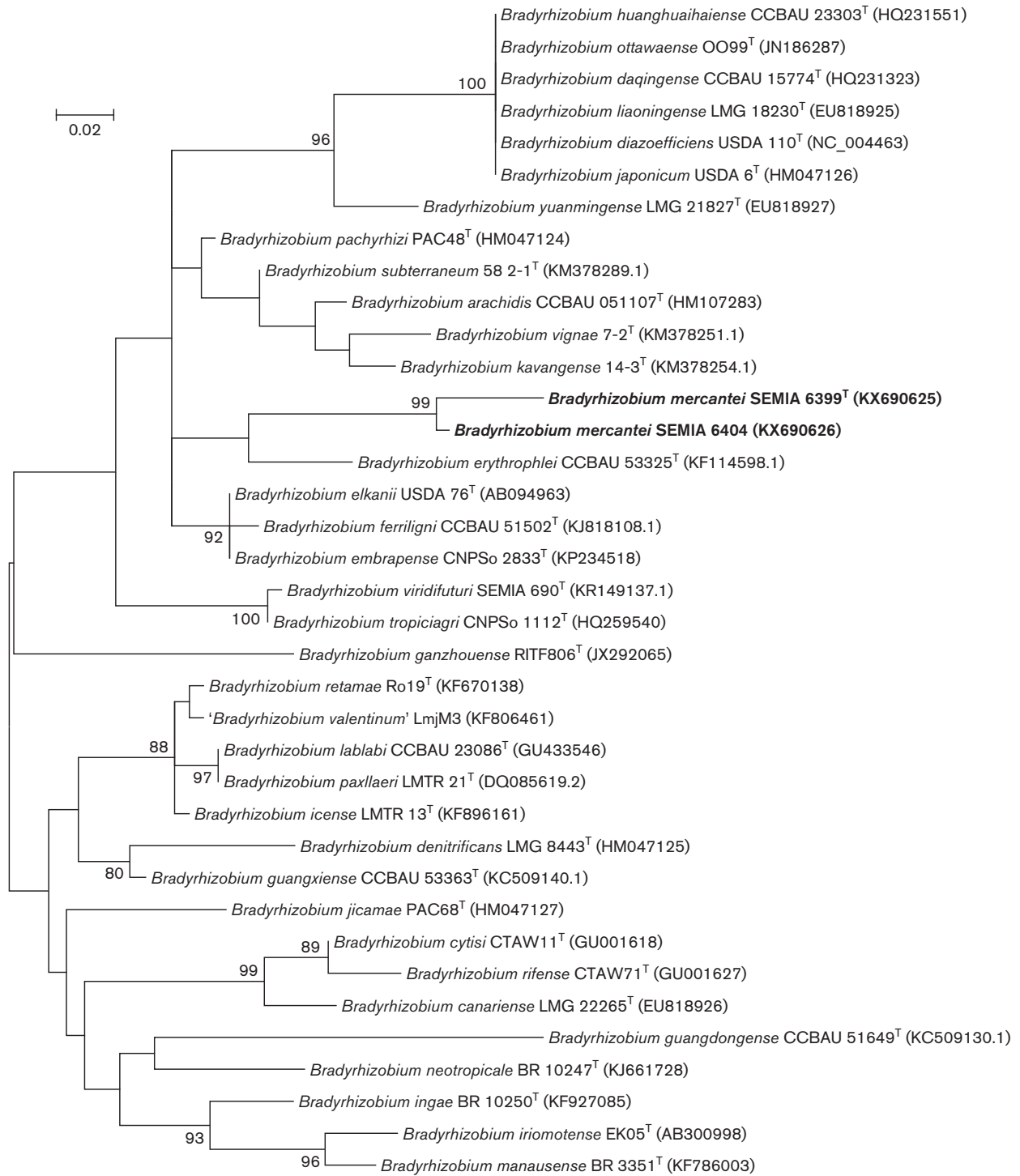


Fig. 3. Maximum-likelihood phylogeny of *nifH* (203 aligned positions) gene sequences. Accession numbers are indicated within parentheses. Strains of the novel species are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

API test, able to grow with glycerol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitol, D-sorbitol, aesculin, glycogen, xylitol,

D-lyxose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol and L-arabitol; grows weakly with erythritol, D-adonitol, methyl β -D-xylopyranoside, L-rhamnose, dulcitol, inositol, arbutin, salicin, maltose,

Table 2. Distinctive morpho-physiological features of *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov. strains and related species of the genus *Bradyrhizobium*

1. *B. mercantei* sp. nov. SEMIA 6399^T; 2. *B. mercantei* sp. nov. SEMIA 6404; 3. *B. elkani* USDA 76^T; 4. *B. embrapense* CNPSo 2833^T; 5. *B. ferriligni* CCBAU 51502^T; 6. *B. pachyrhizi* PAC48^T; 7. *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T; 8. *B. viridifuturi* SEMIA 690^T. Data represent the means of two biological replicates. Growth; –, no growth; w, weakly positive; ND, not determined.

Characteristic	1	2	3*	4*	5	6*	7*	8†
Growth at/in/with:								
pH 4.5	+	+	–	+	–	w	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	w
LB	–	–	–	+	ND	–	–	–
37 °C	–	–	–	+	+	–	–	–
40 °C	–	–	–	–	+	–	–	–
NaCl 1 %	–	–	–	–	+	–	–	–
Urea 2 %	+	+	+	+	ND	+	+	+
Carbohydrates								
Glycerol	+	w	w	w	w	w	w	w
Erythritol	w	–	–	–	–	–	–	–
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	w	+
L-Xylose	+	+	+	+	+	+	w	+
D-Adonitol	w	w	w	–	w	w	w	w
Methyl β-D-xylopyranoside	w	w	–	–	–	–	–	–
D-Galactose	+	+	+	+	w	+	+	w
D-Glucose	+	+	w	+	w	w	–	w
D-Fructose	+	w	w	w	w	w	w	w
D-Mannose	+	w	+	+	w	+	+	w
L-Sorbose	–	w	–	–	–	–	–	w
Dulcitol	w	–	w	–	–	–	w	–
Inositol	w	–	–	–	–	–	–	–
D-Mannitol	+	w	w	w	w	w	w	w
D-Sorbitol	+	w	w	w	w	w	w	w
Arbutin	w	w	–	–	–	–	–	–
Aesculin	+	+	w	–	+	–	w	+
Salicin	w	–	–	–	–	–	–	–
Maltose	w	–	–	–	–	–	–	–
Lactose	w	–	–	–	–	–	–	–
Melibiose	–	–	–	+	–	–	–	–
Melezitose	–	w	–	–	–	–	–	–
Starch	w	–	+	+	–	+	–	+
Glycogen	+	–	–	+	–	–	–	–
Xylitol	+	w	w	–	w	–	–	w
Gentobiose	–	–	–	+	–	–	–	–
D-Turanose	w	w	–	–	–	–	–	–
D-Lyxose	+	+	+	+	+	+	w	w
D-Tagatose	–	+	–	–	–	–	–	–
L-Fucose	+	+	+	+	+	+	w	+
D-Arabitol	+	+	w	w	w	w	w	w
L-Arabitol	+	–	w	–	w	w	–	+
Potassium gluconate	–	–	–	+	–	–	–	–
Potassium 5-ketogluconate	–	–	–	+	–	–	–	–

*Data from Delamuta et al. [8].

†Data from Helene et al. [12].

lactose, starch and turanose; and does not grow with L-sorbose, methyl α-D-mannopyranoside, methyl α-D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, cellobiose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, melezitose, raffinose, gentiobiose, D-tagatose, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate or potassium 5-ketogluconate.

The type strain is SEMIA 6399^T (=CNPSo 1165^T=BR 6010^T=U675^T=LMG 30031^T), isolated from effective nodules of *Deguelia costata* in Brazil. The DNA G+C content of strain SEMIA 6399^T is 63.99 mol%.

Funding information

Partially financed by INCT-CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) (MPCPAgro 465133/2014–2), Embrapa (02.13.08.001.00.00) and CNPq-Universal (400468/2016–6). L.C.R.H. and J.R.M.D. acknowledge PhD and pos-doc fellowships, respectively, from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Acknowledgements

Authors acknowledge Dr Itamar S. Melo and Marcia Parma (Embrapa Meio Ambiente) for help with the fatty acids analyses, Ligia Maria O. Chueire (Embrapa Soja) for help in several steps of this work, and Dr Allan R. J. Eaglesham for English suggestions.

Conflicts of interest

Authors declare no conflicts of interest or ethical problems.

References

- Hungria M, Loureiro MF, Mendes IC, Campo RJ, Graham PH. Inoculant preparation, production and application. In: Werner W and Newton WE (editors). *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*. Dordrecht, Amsterdam: Springer; 2005. pp. 223–254.
- Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martínez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Rosenberg E (editor). *The Prokaryotes – Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013. pp. 427–451.
- Jordan DC. NOTES: transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 1982; 32:136–139.
- Menna P, Barcellos FG, 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:2934–2950.
- Roma Neto IV, Ribeiro RA, Hungria M. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26: 1291–1302.
- Perrineau MM, Le Roux C, de Faria SM, de Carvalho Balieiro F, Galiana A et al. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkani* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. *Syst Appl Microbiol* 2011;34:376–384.
- Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E et al. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group la strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63: 3342–3351.
- Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Parma MM, Melo IS et al. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4424–4433.
- Delamuta JR, Ribeiro RA, Araújo JL, Rouws LF, Zilli JÉ 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.
10. Zilli JE, Baraúna AC, da Silva K, de Meyer SE, Farias EN et al. *Bradyrhizobium neotropiale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolabium paraense*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:3950–3957.
 11. Azarias Guimarães A, Florentino LA, Alves Almeida K, Lebbe L, Barroso Silva K et al. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. *Syst Appl Microbiol* 2015;38:433–441.
 12. Helene LC, Delamuta JR, 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* 2015;65:4441–4448.
 13. Parker MA. The spread of *Bradyrhizobium* lineages across host legume clades: from *Abarema* to *Zygia*. *Microb Ecol* 2015;69:630–640.
 14. Fonseca MB, Peix A, de Faria SM, Mateos PF, Rivera LP et al. Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* riz. (Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian cerrado. *PLoS One* 2012;7:e49520.
 15. Germano MG, Menna P, Mostasso FL, Hungria M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:217–229.
 16. Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 2009;32:101–110.
 17. 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.
 18. Durán D, Rey L, Navarro A, Busquets A, Imperial J et al. *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in eastern Spain. *Syst Appl Microbiol* 2014;37:336–341.
 19. Yao Y, Sui XH, Zhang XX, Wang ET, Chen WX. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:1831–1837.
 20. Menna P, Hungria M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:3052–3067.
 21. Parker MA, Rousteau A. Mosaic origins of *Bradyrhizobium* legume symbionts on the Caribbean island of Guadeloupe. *Mol Phylogenet Evol* 2014;77:110–115.
 22. Zhang XX, Guo HJ, Wang R, Sui XH, Zhang YM et al. Genetic divergence of *Bradyrhizobium* strains nodulating soybeans as revealed by multilocus sequence analysis of genes inside and outside the symbiosis island. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:3181–3190.
 23. de Faria SM, de Lima HC, Franco AA, Mucci ESF, Sprent JI. Nodulation of legume trees from south east Brazil. *Plant Soil* 1987;99:347–356.
 24. Franco AA, de Faria SM. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol Biochem* 1997;29:897–903.
 25. Hungria M, O'Hara GW, Zilli JE, Araujo RS, Deaker R et al. Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson JG and Dilworth JG (editors). *Working with Rhizobia*. Canberra, Australia: ACIAR; 2016. pp. 39–60.
 26. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
 27. 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.
 28. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792–1797.
 29. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
 30. Ahn H, Boulila F, Boulila A, Boucheffa K, Durán D et al. *Cytisus villosus* from northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie Leeuwenhoek* 2014;105:1121–1129.
 31. Guerrouj K, Ruíz-Díez B, Chahboune R, Ramírez-Bahena MH, Abdelmoumen H et al. Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst Appl Microbiol* 2013;36:218–223.
 32. Grönemeyer JL, Hurek T, Büniger W, Reinhold-Hurek B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:62–69.
 33. Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Chahboune R, Toro M, Velázquez E et al. *Bradyrhizobium centrosemiae* (symbiovar *centrosemae*) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar *phaseolarum*) sp. nov. and a new symbiovar (*tropicum*) of *Bradyrhizobium viridifuturi* establish symbiosis with *Centrosema* species native to America. *Syst Appl Microbiol* 2016;39:378–383.
 34. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19126–19131.
 35. 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.
 36. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29:1072–1075.
 37. Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:706–711.
 38. 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. *Applied Soil Ecology* 2006;32:210–220.
 39. Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco, USA: W. H. Freeman and Company; 1973. pp. 573.
 40. Jaccard P. The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist* 1912;11:37–50.
 41. Tighe SW, de 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.
 42. Hungria M, Chueire Lígia Maria de O, Coca RG, Megías M. Preliminary characterization of fast growing strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol Biochem* 2001;33:1349–1361.

1 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

2 DOI: 10.1099/ijsem.0.001870

3

4

Supplementary Material

5

6 ***Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules**

7 **of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*)**

8

9 Luisa Caroline Ferraz Helene, Jakeline Renata Marçon Delamuta, Renan Augusto

10 Ribeiro, Mariangela Hungria

11

12 Corresponding author: Mariangela Hungria, Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970,

13 Londrina, PR, Brazil. E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br;

14 biotecnologia.solo@hotmail.com

15 **Table S1.** SEMIA strains and closely related *Bradyrhizobium* species used in this study.

Strain	Other strain names	Original host specie	Geographical origin	Reference for species definition
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	CNPSo 1165 ^T , BR 6010 ^T , U1303 ^T	<i>Deguelia costata</i>	Brazil	This study
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6404	CNPSo 1170, BR 6009	<i>Deguelia costata</i>	Brazil	This study
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	ATCC 49852 ^T , DSM 11554 ^T , NBRC 14791 ^T , LMG 6134 ^T , CNPSo 62 ^T	<i>Glycine max</i>	USA	Kuykendall <i>et al.</i> (1992)
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T	CIAT 2372 ^T , BR 2212 ^T , SEMIA 6208 ^T , U674 ^T , LMG 29087 ^T	<i>Desmodium heterocarpon</i>	Colombia	Delamuta <i>et al.</i> (2015)
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	HAMBI 3614 ^T , CGMCC 1.13002 ^T , LMG 28425 ^T	<i>Eryhrophleum fordii</i>	China	Yao <i>et al.</i> (2015)
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	HAMBI 3613 ^T , CGMCC 1.13001 ^T	<i>Eryhrophleum fordii</i>	China	Yao <i>et al.</i> (2015)
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	HAMBI 3584 ^T , CNPSo 2583 ^T	<i>Phaseolus lunatus</i>	Peru	Durán <i>et al.</i> (2014a)
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	CECT 7395 ^T , LMG 24556 ^T , CNPSo 2076 ^T	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Honduras	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> (2009)
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	LMG 25572 ^T , CNPSo 2459 ^T	<i>Lablab purpureus</i>	China	Chang <i>et al.</i> (2011)
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T	HAMBI 3599 ^T , CNPSo 2763 ^T	<i>Centrolobium paraense</i>	Brazil	Zilli <i>et al.</i> (2014)
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	LMG 24246 ^T , CECT 7396 ^T , CNPSo 2077 ^T	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Costa Rica	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> (2009)
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	DSM 18454 ^T , HAMBI 2911 ^T , CNPSo 2582 ^T	<i>Phaseolus lunatus</i>	Peru	Durán <i>et al.</i> (2014a)
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	LMG 27393 ^T , CECT 8261 ^T , CNPSo 2586 ^T	<i>Retama monosperma</i>	Morocco	Guerrouj <i>et al.</i> (2013)
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	SMS 303 ^T , BR 1009 ^T , SEMIA 6148 ^T , LMG 28867 ^T	<i>Neonotonia wightii</i>	Brazil	Delamuta <i>et al.</i> (2015)
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	LMG 27619 ^T , CECT 8364 ^T , CNPSo 2587 ^T	<i>Lupinus mariae-josephae</i>	Spain	Durán <i>et al.</i> (2014b)
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	CNPSo 991 ^T , C 100a ^T , BR 1804 ^T , LMG 28866 ^T	<i>Centrosema pubescens</i>	Brazil	Helene <i>et al.</i> (2015)

17 **Table S2.** Accession numbers of the sequences of the housekeeping genes used in this
 18 study. Sequences obtained in this study are shown in bold. Primers and DNA
 19 amplification conditions used in this study according to Delamuta *et al.* (2013).
 20

Strain	Genome	<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T		KX690617	KX690621	KX690623	KX690615
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6404		KX690618	KX690622	KX690624	KX690616
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T		KJ560556	HM107251	JX437675	HM107233
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T		FM253303	AB353733	AB353735	AB353734
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T		AY923047	AY386765	FM253220	FM253177
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T		KF532219	GU001594	KF532653	KF532947
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T		KF962684	HQ231301	JX437669	HQ231270
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T		KF962685	HM047121	FM253239	EU665419
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463				
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T		AY328392	AY599117	AM418800	AY591568
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 ^T		KP234519.2	GQ160500	HQ634891	HQ634899
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T		KX690620	KF114693.1	KF114717.1	KF114669.1
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T		KX690619	KJ818099.1	KJ818102.1	KJ818112.1
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T		KP420023	JX277110	KP420022	JX277144
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T		KC508964.1	KC509023.1	KC509072.1	KC509269.1
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T		KC508974.1	KC509033.1	KC509082.1	KC509279.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T		KF962686	HQ231639	JX437672	HQ231595
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T		KF896182	KF896175	KF896201	JX943615
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T		KF927055	KF927067	KF927079	KF927061
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T		JF308944	AB300995	AB300997	AB300996
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T		AM182120	HQ587875	AB070586	AM182158
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T		JF308945	FJ428204	HQ873309	HM047133
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T		KR259949.1	KM378446.1		KM378399.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T		KF962687	GU433498	JX437670	GU433522
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T		AY923041	AY386775	FM253223	FM253180
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T		KF786001	KF785986	KF786000	KF785992
<i>B. neotropicae</i> BR 10247 ^T		KJ661693	KJ661700	KJ661707	KJ661714
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T		KF962688	JQ619233	KF962697	JQ619231
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T		JF308816	HQ587750	HQ873179	HQ587287
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T		JF308946	FJ428201	HQ873310	HM047130
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T		AY923038	KF896169	KF896195	JX943617
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T		KF896184	KC247108	KF896204	KF962711
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T		JQ945187	KF962692	KF532654	KF532948
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T		KP308157.1	KM378484.1		KM378397
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T		FJ391008.1	FJ391048	HQ634890	FJ391168
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	SAMN02688507		JX518575		JX518589.2
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T		KR259951.1	KM378443.1		KM378374.1
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T		KR149128	KR149131	KR149134	KR149140
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T		FM253312	AY386780	FM253226	FM253183
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	NC_009720				

21

22

23 **Table S3.** Range of nucleotide identity (NI, %) between SEMIA strains and
 24 *Bradyrhizobium* type strains in the 16S rRNA and housekeeping sequences. ND (not
 25 determined).
 26

	16S rRNA (1227 bp)	<i>dnaK</i> (223 bp)	<i>glnII</i> (505 bp)	<i>gyrB</i> (552 bp)	<i>recA</i> (360 bp)	Concatenated (MLSA)
within <i>B. mercanteistrains</i>:	100	100	98.4	98.9	99.0	99.0
between <i>B. mercanteistrains</i> and:						
<i>B. arachidis</i>	96.7	88.3	89.1 - 89.7	90.9 - 91.4	90.9	90.9
<i>B. betae</i>	97	88.3	87.9 - 88.5	90.9 - 91.4	90.1 - 90.4	90.1 - 90.4
<i>B. canariense</i>	97.1	86.9	85.9 - 86.9	91.4 - 91.8	89.7 - 90.1	89.7 - 90.1
<i>B. cytisi</i>	96.5	87.8	86.5 - 87.3	90.7 - 91.1	89.5 - 89.9	89.5 - 89.9
<i>B. daqingense</i>	97.3	89.2	88.3 - 89.3	92.2 - 92.3	90.7 - 91.0	90.7 - 91.0
<i>B. denitrificans</i>	96.9	86.9	86.1 - 87.1	88.5 - 88.7	87.7 - 88.1	87.7 - 88.1
<i>B. diazoefficiens</i>	97	88.3	88.3 - 89.1	93.1 - 93.4	90.6 - 90.9	90.6 - 90.9
<i>B. elkanii</i>	99.7	97.7	94.8 - 95.2	95.2 - 95.6	95.3 - 95.6	95.3 - 95.6
<i>B. embrapense</i>	100	93.7	95.2 - 96.0	93.6 - 94.0	94.2 - 94.6	94.2 - 94.6
<i>B. erythrophlei</i>	100	90.1	93.4 - 93.8	91.4 - 91.8	92.8 - 93.1	92.8 - 93.1
<i>B. ferriligni</i>	97.7	98.2	94.0 - 94.8	93.1 - 93.2	94.7 - 95.1	94.7 - 95.1
<i>B. ganzhouense</i>	96.9	88.7	87.5 - 88.1	91.3 - 91.6	89.8 - 90.0	89.8 - 90.0
<i>B. guangdongense</i>	96.8	87.4	86.7 - 87.3	92.3	89.8 - 90.0	89.8 - 90.0
<i>B. guangxiense</i>	97	87.4	87.5 - 88.5	91.4	90.3 - 90.6	90.3 - 90.6
<i>B. huanghuaihaiense</i>	96.9	89.2	87.5 - 88.1	92.3 - 92.7	90.4 - 90.7	90.4 - 90.7
<i>B. icense</i>	99.9	91.4	89.5 - 90.2	88.2 - 88.4	90.1 - 90.3	90.1 - 90.3
<i>B. ingae</i>	96.5	89.2	88.1 - 89.3	90.2 - 90.3	89.6 - 89.9	89.6 - 89.9
<i>B. iriomotense</i>	96.4	90.5	85.7 - 86.9	91.1	89.4 - 89.7	89.4 - 89.7
<i>B. japonicum</i>	97.3	89.2	87.3 - 87.9	92.0 - 92.2	90.4 - 90.6	90.4 - 90.6
<i>B. jicamae</i>	99.6	90.1	89.7 - 90.2	90.2	90.1 - 90.3	90.1 - 90.3
<i>B. kavangense</i>	96.6	88.7	87.7 - 88.7	ND	ND	ND
<i>B. lablabi</i>	99.8	90.1	91.4 - 91.6	89.4	91.2	91.2
<i>B. liaoningense</i>	97.3	88.7	89.3 - 89.7	91.8	91.1 - 91.2	91.1 - 91.2
<i>B. manausense</i>	96.7	88.3	88.5 - 88.7	90.3 - 90.5	90.2 - 90.3	90.2 - 90.3
<i>B. neotropiale</i>	98.8	87.8	87.1 - 88.1	90.7 - 90.9	90.0 - 90.1	90.0 - 90.1
<i>B. oligotrophicum</i>	96.9	88.7	84.9 - 85.9	88.4 - 88.7	87.8 - 88.2	87.8 - 88.2
<i>B. ottawaense</i>	97.3	87.8	88.5 - 89.7	91.1 - 91.4	90.1 - 90.6	90.1 - 90.6
<i>B. pachyrhizi</i>	99.8	97.7	94.2 - 95.0	94.7 - 95.1	95.3 - 95.6	95.3 - 95.6
<i>B. paxllaeri</i>	99.9	91	90.0 - 90.6	90.2	90.4 - 90.7	90.4 - 90.7
<i>B. retamae</i>	99.4	89.6	89.3 - 90.0	87.5 - 87.8	89.7 - 90.1	89.7 - 90.1
<i>B. rifense</i>	96.8	88.7	87.1 - 87.9	90.5 - 91.3	89.6 - 90.1	89.6 - 90.1
<i>B. subterraneum</i>	97.2	90.1	88.7 - 89.7	ND	ND	ND
<i>B. tropiciagri</i>	99	98.6	94.0 - 94.6	95.6 - 96.0	95.5 - 95.9	95.5 - 95.9
<i>B. valentinum</i>	99.6	89.2	86.5	86.4 - 86.7	88.5 - 88.7	88.5 - 88.7
<i>B. vignae</i>	96.6	89.2	88.3 - 88.9	ND	ND	ND
<i>B. viridifuturi</i>	100	99.1	93.6 - 94.4	95.8 - 96.1	95.7 - 96.1	95.7 - 96.1
<i>B. yuanmingense</i>	96.9	87.8	88.5 - 89.1	91.1 - 91.3	90.5 - 90.8	90.5 - 90.8

27 **Table S4.** Fatty acid profile (%) of SEMIA 6399^T and related species grown for 7 days
 28 at 28 °C on YMA. Data obtained with the MIDI system using FAME library TSBA6.
 29 Analyses performed in a GC Agilent model 6850 with an Ultra 2 column (25 m length,
 30 ID 0.2 mm, film f 0.33 µm), detector FID, carrier gas hydrogen (30 mL/min), and make-
 31 up gas nitrogen (30mL/min), automatic injector series 7683 (liner 19251-60540),
 32 injection of 2 µL, run of 25 min. Injector temperature of 250 °C and of the detector of
 33 300 °C. Program of the oven temperature: initial of 170 °C, raising 5 °C/ min till 260 °C
 34 (hold for 18 min), then raised at 40 °C/min till 310 °C (hold for 1.5 min).

35 Strains: 1. *B. mercantei* SEMIA 6399^T; 2. *B. elkanii* USDA 76^T; 3. *B. embrapense* CNPSo
 36 2833^T; 4. *B. erythrophlei* CCBAU 53325^T; 5. *B. ferriligni* CCBAU 51502^T; 6. *B.*
 37 *pachyrhizi* PAC48^T; 7. *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T; 8. *B. viridifuturi* SEMIA 690^T.

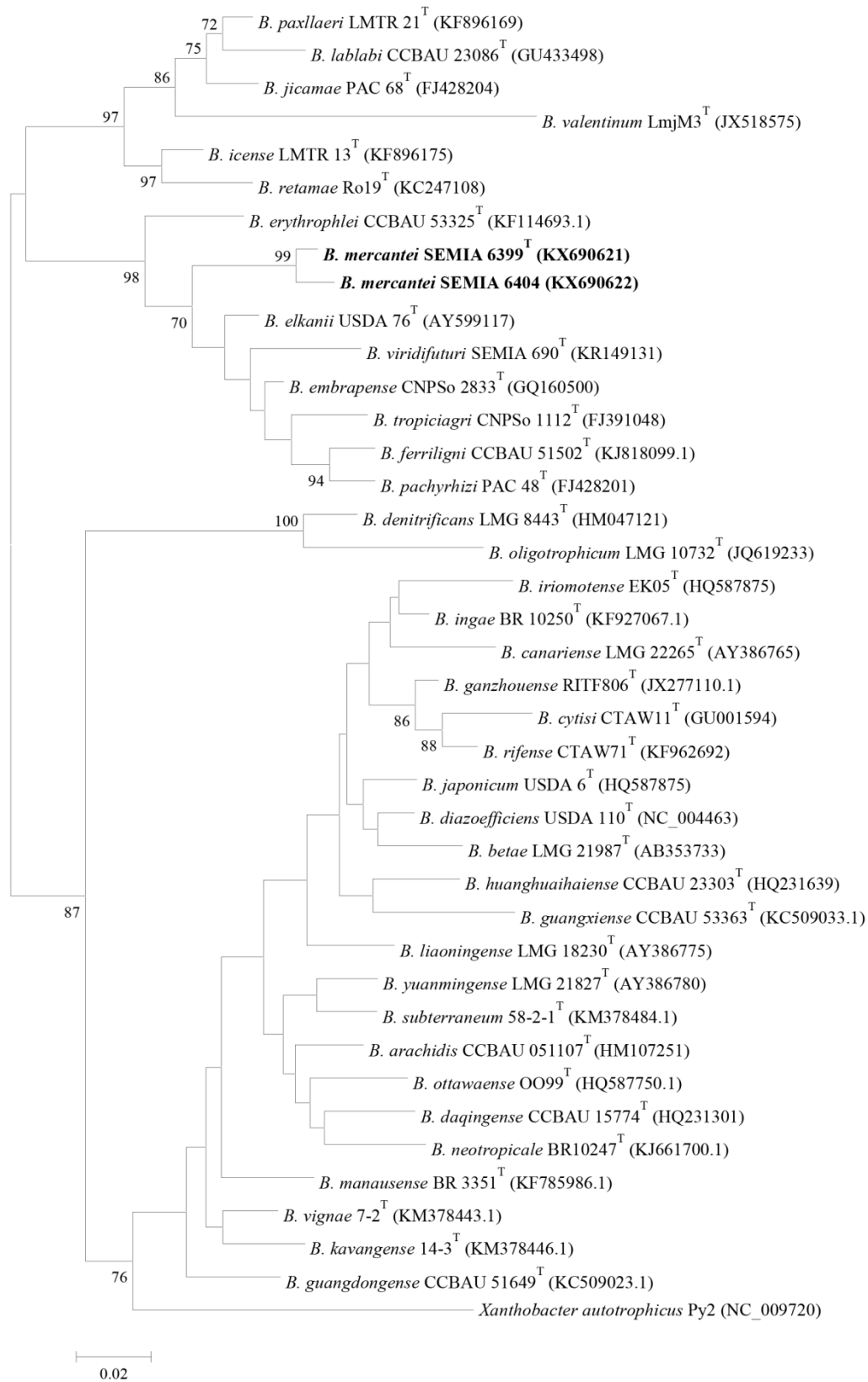
Fatty acid	1	2 ^a	3 ^a	4 ^b	5	6 ^a	7 ^a	8 ^c
C16:0	13.41	11.07	16.51	15.3	17.70	5.97	15.83	11.46
C16:1ω5c				0.7	0.76			2.62
C19:0 cyclo ω8c	13.04	13.67	26.51	18.2	30.71	4.77	15.09	28.01
Summed features								
8*	72.67	75.26	56.99	58.4	50.03	89.26		57.91

* Summed feature 8= C_{18:1ω6c}/C_{18:1ω7c}

^aData from Delamuta *et al.*(2015)

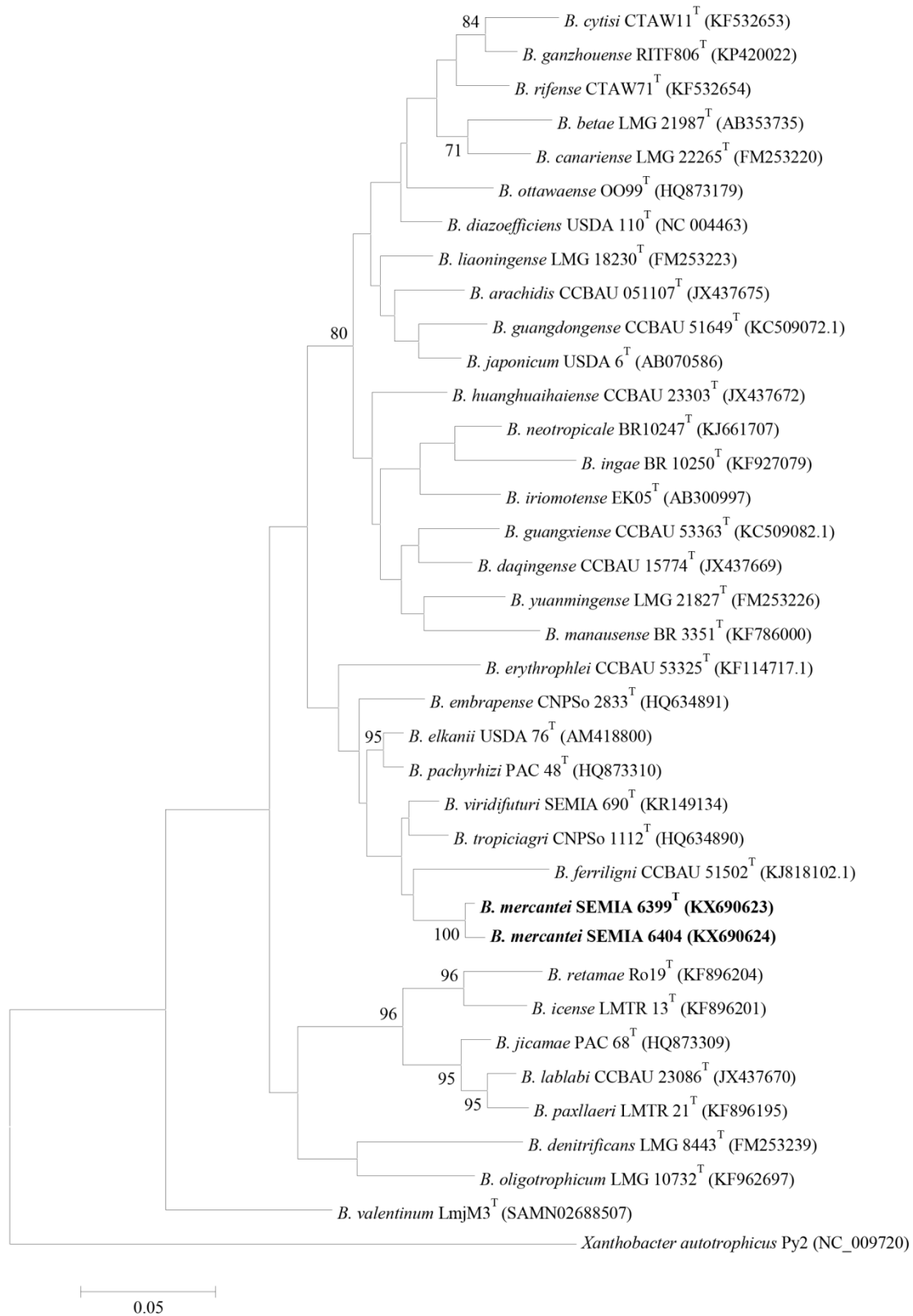
^b Data from Yao *et al.* (2015)

^cData from Helene *et al.* (2015)



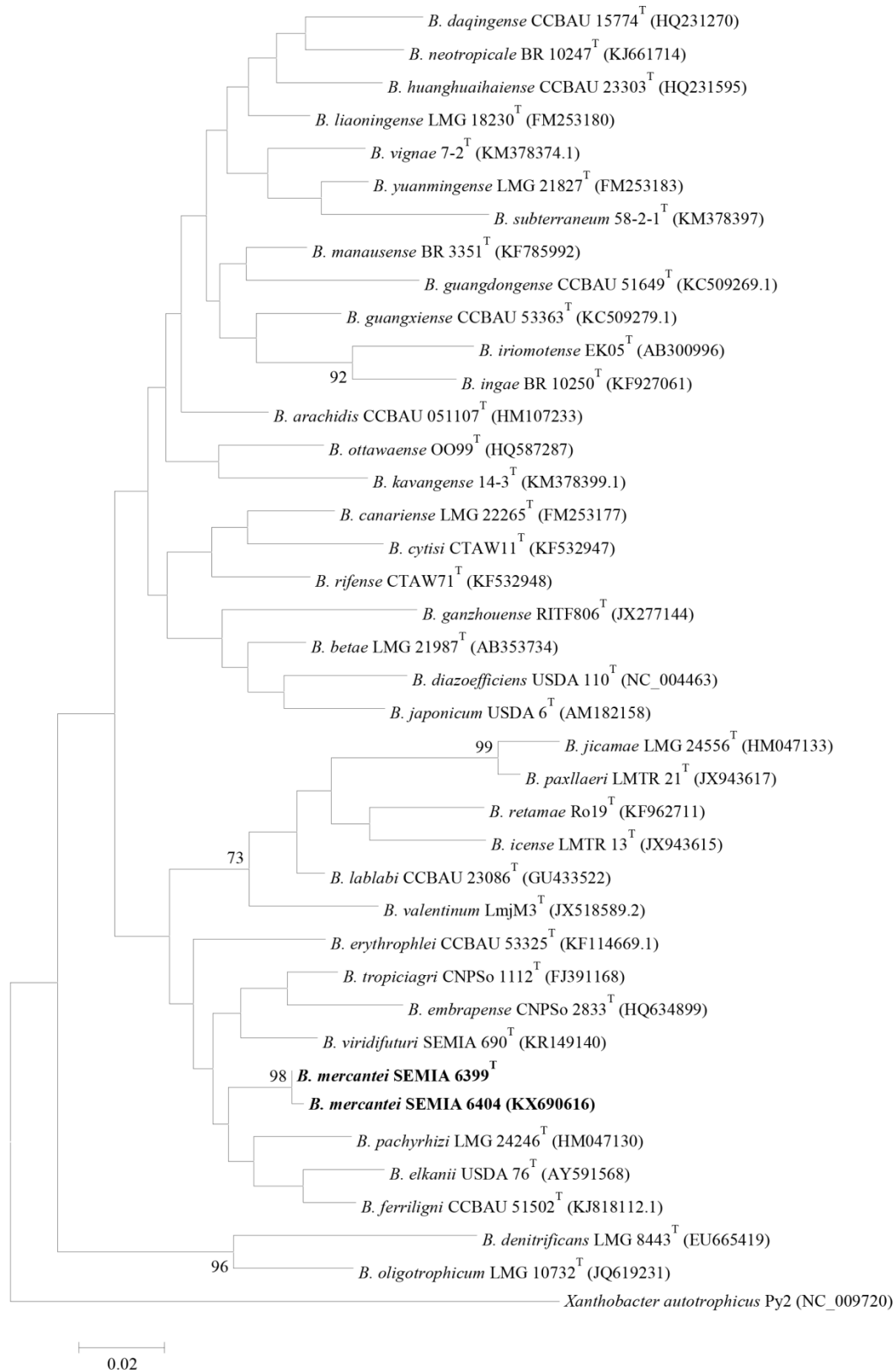
39

40 **Fig. S1.** Maximum likelihood phylogram based on *glnII* gene sequences (505 bp).
 41 GenBank accession numbers are provided in parentheses. SEMIA strains are shown in
 42 bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Xanthobacter*
 43 *autotrophicus* Py2 was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100
 44 nucleotide positions.



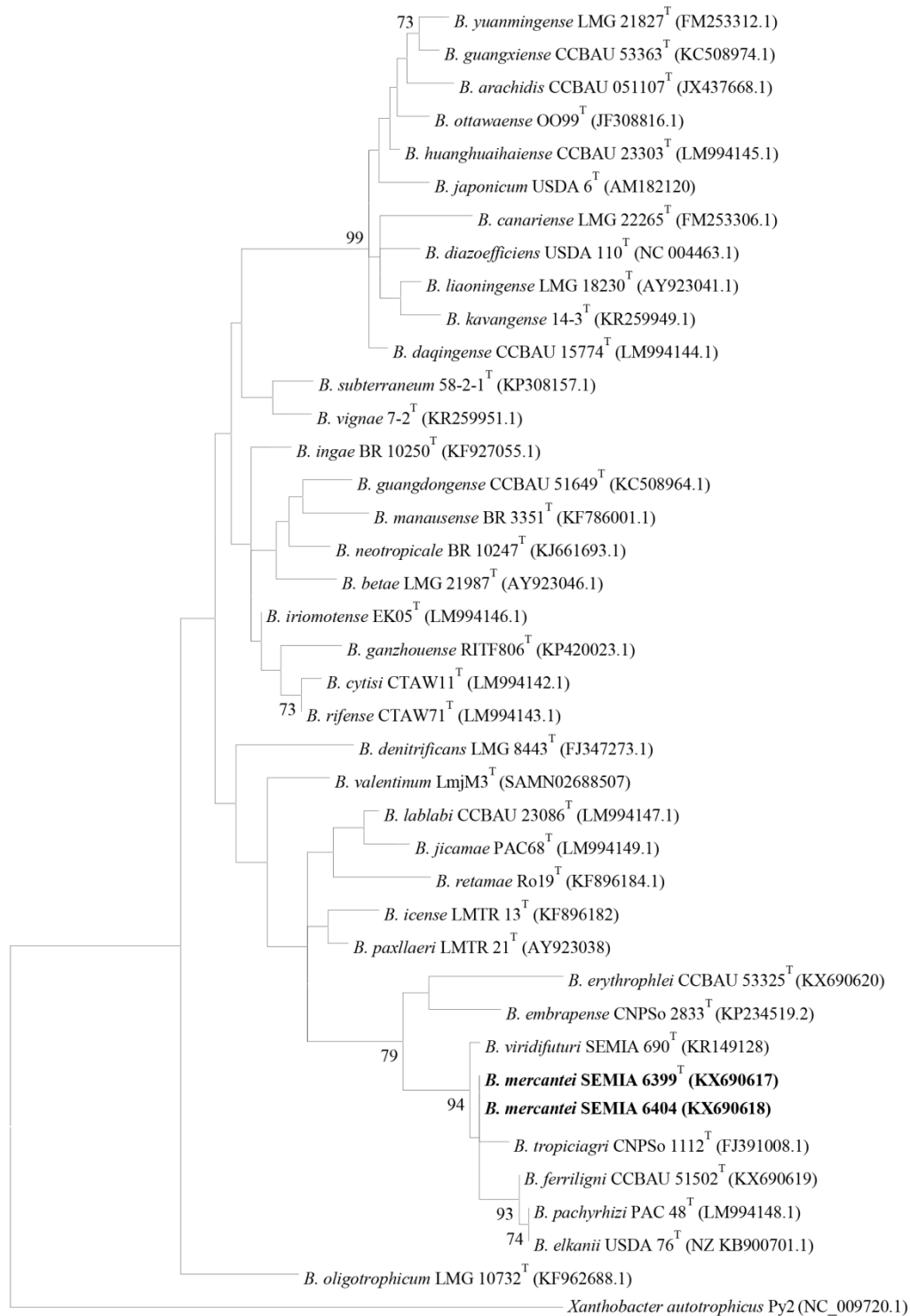
45

46 **Fig. S2.** Maximum likelihood phylogram based on *gyrB* gene sequences (552 bp).
47 GenBank accession numbers are provided in parentheses. SEMIA strains are shown in
48 bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Xanthobacter*
49 *autotrophicus* Py2 was used as outgroup. Bar indicates five substitutions per 100
50 nucleotide positions.



51

52 **Fig. S3.** Maximum likelihood phylogram based on *recA* gene sequences (360 bp).
 53 GenBank accession numbers are provided in parentheses. SEMIA strains are shown in
 54 bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Xanthobacter*
 55 *autotrophicus* Py2 was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100
 56 nucleotide positions.

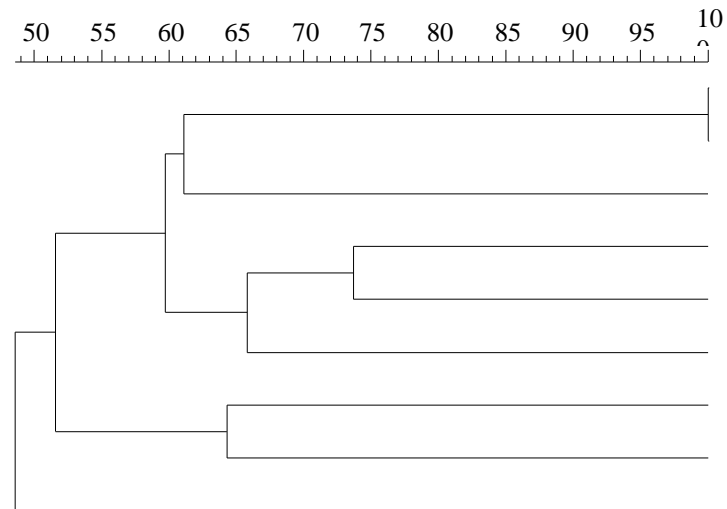


57

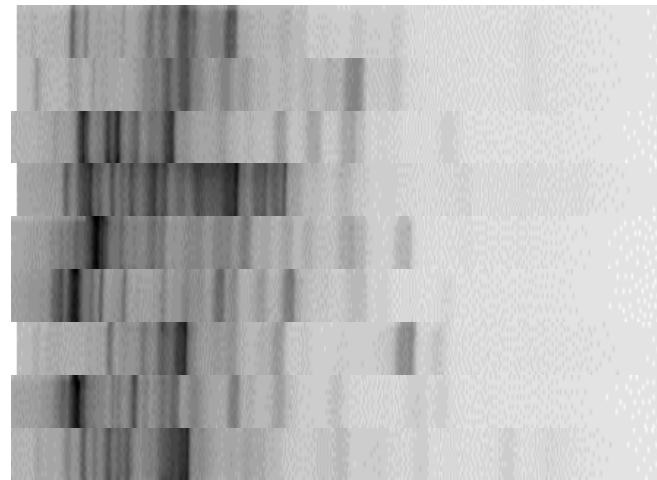
0.05

58 **Fig. S4.** Maximum likelihood phylogram based on *dnaK* gene sequences (223 bp).
59 GenBank accession numbers are provided in parentheses. SEMIA strains are shown in
60 bold. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Xanthobacter*
61 *autotrophicus* Py2 was used as outgroup. Bar indicates five substitutions per 100
62 nucleotide positions.

BOX-PCR



BOX-PCR



***B. mercantei* SEMIA 6399^T**

***B. mercantei* SEMIA 6404**

*B. tropiciagri*CNPSo 1112^T

B. viridifuturi SEMIA 690^T

B. elkanii USDA 76^T

B. pachyrhizi PAC 48^T

B. ferriligni CCBAU 51502^T

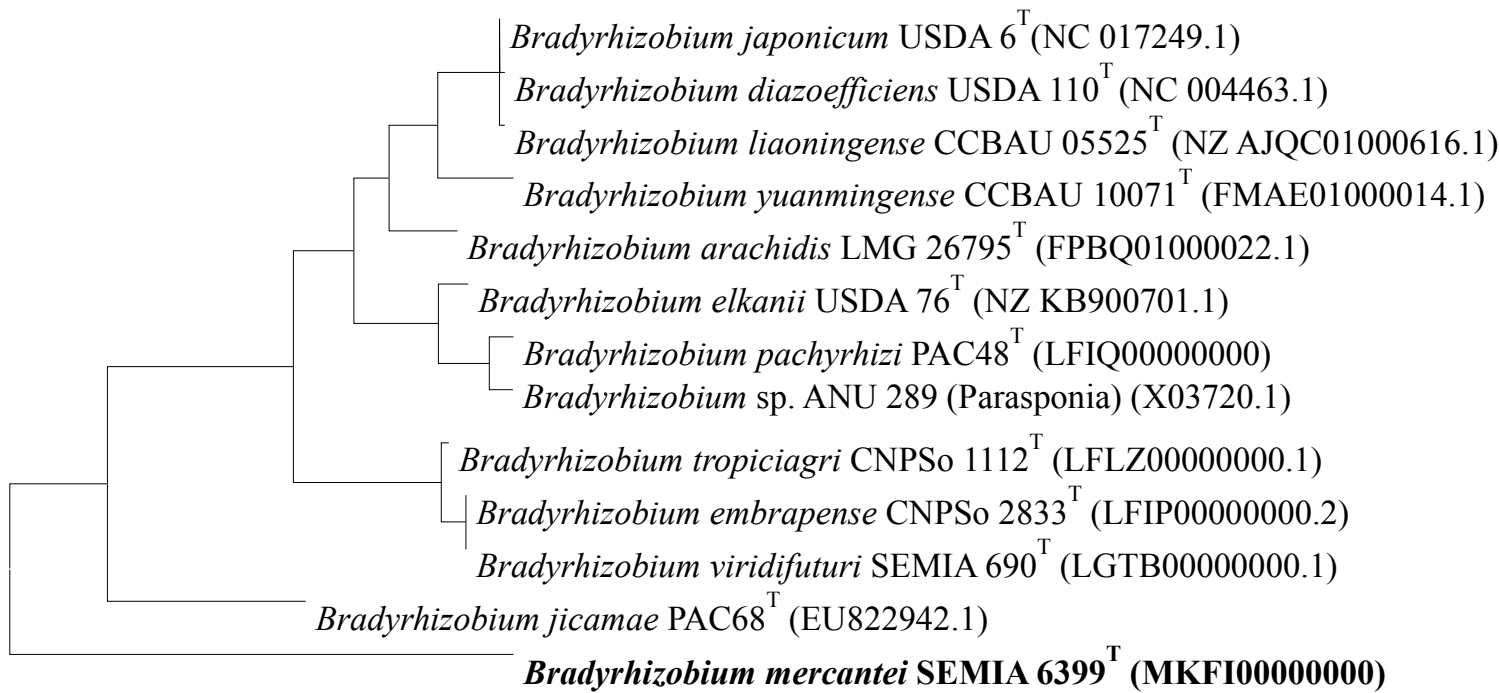
B. embrapense CNPSo 2833^T

*B. erythrophlei*CCBAU 53325^T

63

64

65 **Fig. S5.** Cluster analysis of products obtained by BOX-A1R-PCR of SEMIA strains (shown in bold) and closely related *Bradyrhizobium* species.
66 Analysis performed with software Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6) using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair-
67 Group Method with Arithmetic mean) and the Jaccard coefficient, with 2% tolerance.




0.05

68

69 **Figure S6.** Maximum likelihood phylogeny of *nodD*(394aligned positions) gene
70 sequences. Accession numbers are indicated within parenthesis. Strain of the novel
71 species is shown in boldface. Bootstrap values >70% are indicated at the nodes. Bar
72 indicates fivesubstitutions per 100 nucleotide positions.



Genome Sequence of *Bradyrhizobium mercantei* Strain SEMIA 6399^T, Isolated from Nodules of *Deguelia costata* in Brazil

Renan Augusto Ribeiro,^a Luisa Caroline Ferraz Helene,^{b,c,d}
Jakeline Renata Marçom Delamuta,^{b,d}  Mariangela Hungria^{a,b,c}

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brazil^a; Embrapa Soja, Londrina, Brazil^b; Universidade Estadual de Londrina (UEL), Department of Biochemistry and Biotechnology, Londrina, Brazil^c; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, Brazil^d

ABSTRACT SEMIA 6399^T is the type strain of *Bradyrhizobium mercantei*, a nitrogen-fixing symbiont of *Deguelia costata*. Its draft genome contains 8,842,857 bp with 8,246 predicted coding sequences (CDS), several related to amino acids and derivatives and to stress tolerance, with an emphasis on oxidative stress, in addition to symbiotic genes.

Bacteria known as rhizobia are capable of establishing symbioses with a broad range of legumes, resulting in the nitrogen fixation process, with high impact on agriculture productivity and environmental sustainability. In the tropics, *Bradyrhizobium* bacteria are the predominant symbionts of legumes (1–3). The genus occupies a variety of ecosystems and is enriched in living styles (1–4), and in the past few years, our group has reported large genetic diversity among Brazilian *Bradyrhizobium* strains (2, 3), resulting in the description of new species within this genus (5–7).

Here, we report the draft genome of strain SEMIA 6399^T (=CNPSo 1165^T = BR 6010^T = U675^T = LMG 30031^T) of the recently described new species *Bradyrhizobium mercantei* (8). The strain is a symbiont of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*), an important legume native to eastern Brazil; SEMIA 6399^T has been used in commercial inoculants for this legume in Brazil since 1994 (8). The species is named after Fábio Martins Mercante (1963 to 2016), an extraordinary Brazilian microbiologist from Embrapa who dedicated his career to studies on biological nitrogen fixation (8).

To access the bacterial genome sequence, total DNA was extracted using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) and processed on the MiSeq platform (Illumina) at Embrapa Soja, Londrina, Brazil. Shotgun sequencing allowed a genome coverage of approximately 29-fold. The FASTQ files were *de novo* assembled by the A5-MiSeq pipeline (9). The genome was estimated at 8,842,857 bp, assembled in 72 contigs, with a G+C content of 63.99 mol%. Average nucleotide identity (ANI) with the closest species, *B. tropiciagri* CNPSo 1112^T, was 91.5%.

Sequences were submitted to RAST (10), and annotation identified 8,243 coding sequences (CDS). The analysis at the SEED system (11) allowed the classification of 41% of the CDS in 502 subsystems. Nitrogen fixation genes (*nif*) showed similarity with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T, and strain SEMIA 6399^T also possesses genes coding for the hydrogenase that may improve the efficiency of the nitrogen fixation process (12). Interestingly, the major category of putative genes was of the metabolism of amino acids and derivatives (15.3%), followed by the carbohydrates (14.5%). The genome is enriched with genes of resistance to antibiotics and toxic compounds (117 CDS) and genes of type I, II, III, and IV secretion systems, and it carries 214 CDS of stress response, the majority (55.1%) of which are related to the oxidative stress metabolism.

Received 27 July 2017 Accepted 31 July 2017 Published 7 September 2017

Citation Ribeiro RA, Helene LCF, Delamuta JRM, Hungria M. 2017. Genome sequence of *Bradyrhizobium mercantei* strain SEMIA 6399^T, isolated from nodules of *Deguelia costata* in Brazil. *Genome Announc* 5:e00943-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00943-17>.

Copyright © 2017 Ribeiro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Mariangela Hungria, mariangela.hungria@embrapa.br.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under accession number [MKFI00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/MKFI00000000). The version described in this paper is MKFI01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by CNPq-Universal (400468/2016-6), Embrapa (02.13.08.001.00.00), and INCT-Plant-Growth Promoting Microorganisms for Agricultural Sustainability and Environmental Responsibility (CNPq 465133/2014-2; Fundação Araucária).

REFERENCES

- Menna P, Barcellos FG, Hungria M. 2009. 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2934–2950. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009779-0>.
- Menna P, Hungria M. 2011. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:3052–3067. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028803-0>.
- Hungria M, Menna P, Delamuta JRM. 2015. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes, p 191–202. *In* de Bruijn FJ (ed.), *Biological nitrogen fixation*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch18>.
- Eaglesham ARJ, Ellis JM, Evans WR, Fleischman DE, Hungria M, Hardy RWF. 1990. The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium*: characteristics, p 805–811. *In* Gresshoff PM, Roth LE, Stacey G, Newton WE (ed.), *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. Chapman & Hall, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6432-0_69.
- Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M. 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3342–3351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049130-0>.
- Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Parma MM, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M. 2015. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4424–4433. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000592>.
- Helene LCF, Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Rogel MA, Martínez-Romero E, Hungria M. 2015. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4441–4448. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000591>.
- Helene LCF, Delamuta JRM, Ribeiro RA, Hungria M. 2017. *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1827–1834. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001870>.
- Coil D, Jospin G, Darling AE. 2015. A5-MiSeq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 31:587–589. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
- Neves MCP, Hungria M, Sprent JI. 1987. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Crit Rev Plant Sci* 6:267–321. <https://doi.org/10.1080/07352688709382252>.

7 ESTUDO 2

Mesorhizobium atlanticum sp. nov., uma nova espécie fixadora de nitrogênio dos solos da Mata Atlântica brasileira.

A fixação biológica do nitrogênio, realizada por bactérias diazotróficas, é um processo vital para a agricultura e a sustentabilidade ambiental. Nos últimos anos, a classificação bacteriana tem sido baseada em dados genômicos, acelerando o entendimento sobre a diversidade e resultando na descrição de várias novas espécies. Neste estudo, quatro estirpes (CNPSo 3140^T, CNPSo 3235, CNPSo 3236 e CNPSo 3237) provenientes de amostras de solos da Mata Atlântica e isoladas utilizando *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa pudica* como plantas-isca foram submetidas a uma análise polifásica para investigar a classificação apropriada dentro do gênero *Mesorhizobium*. Os filogramas baseados no 16S RNAr mostraram que as sequências dessas estirpes são idênticas às sequências de *M. acaciae* e *M. plurifarum*, não permitindo uma classificação taxonômica clara; entretanto, quando utilizada a *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), as estirpes foram agrupadas, com alto suporte estatístico, em um grupo distinto, compartilhando menos de 94,5 % de identidade nucleotídica (*Nucleotide Identity*, NI) com as outras espécies do gênero. A identidade média de nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity*, ANI) do genoma da estirpe CNPSo 3140^T mostrou valores abaixo do limite definido para espécies, quando comparado com as espécies mais próximas de *Mesorhizobium* (< 90 %). A filogenia do gene de nodulação (*nodC*) posicionou as estirpes em um grupo isolado, mostrando alta similaridade com *M. shonense*. Os dados obtidos neste estudo suportam a descrição da nova espécie *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov. A estirpe de referência é a CNPSo 3140^T (=ABIP 206^T =LMG 30305^T =U1602^T), isolada de nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

Palavras-chave: *Mesorhizobium*; fixação biológica do nitrogênio; MLSA; ANI; nodulação.

HELENE, L. C. F.; DALL'AGNOL, R. F.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M. *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov., a new nitrogen-fixing species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Published online 16 april 2019. DOI: 10.1099/ijsem.0.003397

Mesorhizobium atlanticum sp. nov., a new nitrogen-fixing species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome

Luisa Caroline Ferraz Helene,^{1,2,3} Rebeca Fuzinato Dall'Agnol,³ Jakeline Renata Marçon Delamuta^{1,4} and Mariangela Hungria^{1,2,4,*}

Abstract

Biological nitrogen fixation performed by diazotrophic bacteria is a vital process for agricultural and environmental sustainability. In recent years, bacterial classification has been based on genomic data, accelerating our understanding about the diversity, and resulting in the description of several new species. In this study, four strains (CNPSo 3140^T, CNPSo 3235, CNPSo 3236 and CNPSo 3237) trapped by *Phaseolus vulgaris* and *Mimosa pudica* from soil samples of the Brazilian Atlantic Forest biome (*Mata Atlântica*) were submitted to polyphasic analysis to investigate their proper classification within the genus *Mesorhizobium*. The 16S rRNA gene phylogram showed that the strains present sequences identical to those of *Mesorhizobium acaciae* and *Mesorhizobium plurifarum*, not allowing a clear taxonomic classification; however, when using multilocus sequence analysis methodology, the strains were grouped into a well-supported distinct clade, with <94.5% nucleotide identity with the other species of the genus. The average nucleotide identity of CNPSo 3140^T genome showed values below the threshold in relation to the closest species, of 89.75% with *Mesorhizobium plurifarum* and of 88.83% with *Mesorhizobium hawassense*; the digital DNA–DNA hybridization values were 39 and 37.70% with the same species, respectively. Nodulation gene (*nodC*) phylogeny positioned the strains in an isolated cluster, showing greater similarity to *Mesorhizobium shonense*. All data obtained in this study support the description of the novel species *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov. The type strain is CNPSo 3140^T (=ABIP 206^T=LMG 30305^T=U1602^T), isolated from a nodule of *Phaseolus vulgaris*.

One of the most important contributions to soil fertility and plant nutrition is the conversion of atmospheric nitrogen (N₂) into nitrogenous compounds, a complex process called biological nitrogen fixation (BNF), performed by a specific group of prokaryotes. The highest contribution of BNF occurs with a particular group of bacteria known as rhizobia, that can establish intimate relationships with some species of the family Fabaceae (=Leguminosae) [1], providing significant amounts of N for plants of agronomic importance, as well as for legumes used for wood production, pastures and reforestation [2].

Mesorhizobium is a diversified genus that comprises 53 species isolated from nitrogen-fixing root-nodules of legume trees and shrubs distributed worldwide. Some of their hosts include species of the genera *Acacia*, *Alhagi*, *Amorpha*,

Astragalus, *Biserrula*, *Caragana*, *Chamaecrista*, *Leucaena*, *Lotus*, *Phaseolus*, *Prosopis*, *Robinia* and *Sophora* [3–12].

This broad distribution of *Mesorhizobium* allied to its capacity of establishing symbiotic relationships to several plant genera makes it an interesting rhizobial genus for agronomic, ecological and industrial applications. Symbionts which are efficient in nodulation and BNF capacity can be used as inoculants for legumes of agronomic interest; for example, *Mesorhizobium plurifarum* strain BR 3804 is used in commercial inoculants for *Chamaecrista ensiformis* in Brazil [13].

Some rhizobial species may present important features beyond BNF, such as tolerance of salinity and other abiotic stress [14], and production biopolymers [13]. Hence, studies that focus on the evaluation and characterization of the

Author affiliations: ¹Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil; ²Department of Biotechnology, Universidade Estadual de Londrina, 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, 70.040-020 Brasília, Distrito Federal, Brazil; ⁴Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, SHIS QI 1 Conjunto B, Blocos A, B, C e D, Lago Sul, 71605-001 Brasília, Distrito Federal, Brazil.

*Correspondence: Mariangela Hungria, mariangela.hungria@embrapa.br

Keywords: *Mesorhizobium*; biological nitrogen fixation; MLSA; ANI; nodulation.

Abbreviations: ANI, average nucleotide identity; BNF, biological nitrogen fixation; DDH, DNA–DNA hybridization; ML, maximum-likelihood; MLSA, multi-locus sequence analysis; YMA, yeast extract–mannitol–agar.

Genome sequences of *Mesorhizobium atlanticum* CNPSo 3140^T (QMBQ00000000) and of *Mesorhizobium hawassense* AC99b^T (QMBP00000000). One supplementary figure and four supplementary tables are available with the online version of this article.

diversity of *Mesorhizobium* strains may help to clarify their taxonomic positions, evolutionary issues of the BNF process, as well as to identify strains with biotechnological potential.

We describe a new *Mesorhizobium* species, with strain CNPSO 3140^T chosen as type strain. CNPSO 3140^T was isolated from a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodule from a plant inoculated with a soil from the Brazilian Atlantic Forest. The strain has genomic and phenotypic features matching other type strains from the genus. Its genome is estimated at 6.5 Mbp, with 29 contigs and coverage of 109-fold. The G+C content of the genome was 63.7 mol%. We propose for this species the name *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov.

ISOLATION AND ECOLOGY

Mesorhizobium strains used in this study, CNPSO 3140^T, CNPSO 3235, CNPSO 3236 and CNPSO 3237, were isolated and identified in a previous study [12] and are listed in Table S1 (available in the online version of this article). Strains were isolated from legumes used to trap rhizobia from soil samples collected nearby trees from the *Piptadenia* group in the Brazilian Atlantic Forest biome (*Mata Atlântica*), in Seropédica (22° 44' 38" S; 43° 42' 27" W), State of Rio de Janeiro, Brazil. Strain CNPSO 3236 was isolated from a *Mimosa pudica* nodule and strains CNPSO 3140^T, CNPSO 3235 and CNPSO 3237 from *Phaseolus vulgaris* nodules [12]. All strains are deposited at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja (WFCC Collection # 1213, WDCM Collection # 1054), in Londrina, State of Paraná, Brazil, at the Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), Montpellier, France and in other culture collections. Unless otherwise indicated, strains were grown on modified yeast extract-mannitol-agar (modified-YMA) medium at 28 °C [15]. Stock cultures were maintained on YMA at 4 °C, and long-term preservation took place by cryopreservation in YM with 30 % glycerol at -80 °C and -150 °C and by lyophilization.

PHYLOGENY

Total DNA of the strains in study was extracted using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) and used in all molecular analyses. The partial sequences of the 16S rRNA, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *nodC* genes were amplified using primers and conditions as described by Delamuta *et al.* [16] and Dall'Agnol *et al.* [12] and were sequenced in an ABI3500xL sequencer analyser (Applied Biosystems). The other *Mesorhizobium* sequences used in this study were retrieved from the GenBank database. Accession numbers are shown in the phylograms. Maximum-likelihood (ML) phylogenies were obtained with MEGA 7 [17] using the Tamura three-parameter model [18], with gamma-distributed invariant sites (G+I), and a multiple sequence alignment was reconstructed with MUSCLE [19]. Tree node

support was evaluated with bootstrap analysis [20] using 1000 pseudoreplicates.

In the 16S rRNA phylogeny, the *Mesorhizobium* strains presented sequences 100 % identical to *Mesorhizobium acaciae* and *M. plurifarium* (Fig. 1). However, this phylogeny is considered highly conserved for some microbial genera; therefore, we searched for higher variability of informative nucleotide sites by using the multilocus sequence analysis (MLSA). A phylogram was built considering four (*glnII* + *recA* + *rpoB* + *gyrB*) concatenated housekeeping genes (Fig. 2). The *Mesorhizobium* strains were positioned in a well-supported clade separated from other *Mesorhizobium* species, with *M. plurifarium* representing the closest taxon. The phylograms built with each single housekeeping gene also confirmed an isolated clade for the strains (data not shown). The nucleotide identity (NI) calculated for the four concatenated genes ranged from 99.1 to 100 % between strains and from 87.1 to 94.5 % with other species of the genus (Table S2). These results are indicative that our strains belong to a new species.

Since the strains from our study were isolated from root nodules of *P. vulgaris* and *M. pudica*, the evolutionary relationships regarding symbiotic genes were investigated by analysing the *nodC* phylogeny. *Mesorhizobium* strains were positioned in a cluster with high bootstrap support (100 %) distinct from all other species (Fig. 3). Interestingly, the full identity was found considering the strains trapped by *P. vulgaris* and *M. pudica*. *nodC* sequences of the strains from our study showed higher similarity to *Mesorhizobium shonense* and *M. plurifarium* (Fig. 3), in agreement with the MLSA phylogeny (Fig. 2), but not to *Mesorhizobium hawassense*, another species with high similarity in the MLSA. Nodulation ability of CNPSO 3140^T was reported in a previous study by our group, and the strain was capable of forming effective nodules in *P. vulgaris* (Nod⁺ Fix⁺), but did not confirm the ability to nodulate and fix N₂ with *M. pudica* [12]; strain CNPSO 3236 isolated from *M. pudica* was capable of forming effective nodules in *P. vulgaris* (Nod⁺ Fix⁺).

GENOME FEATURES

For the genome sequencing, total DNA was used to build the library using the Nextera XT kit, according to the manufacturer's instructions. The library was processed on the MiSeq platform (Illumina) at Embrapa Soja. Drafts of the whole genomes of strain CNPSO 3140^T (accession number QMBQ00000000, Biosample SAMN09456167) and of *M. hawassense* AC99b^T (accession number QMBP00000000, Biosample SAMN09456072) were assembled with the A5-miseq pipeline (*de novo*). The genome sequence of the type strain of *M. plurifarium* LMG 11892^T (=ORS1032^T) (NZ_CCND01000012.1) was retrieved from the JGI. *M. plurifarium* and *M. hawassense* were the type strains chosen as comparison because they were the most related species in the MLSA analysis (Fig. 2). Shotgun sequences of CNPSO 3140^T allowed a genome coverage of 109-fold assembled in 29 contigs, with an N50 of

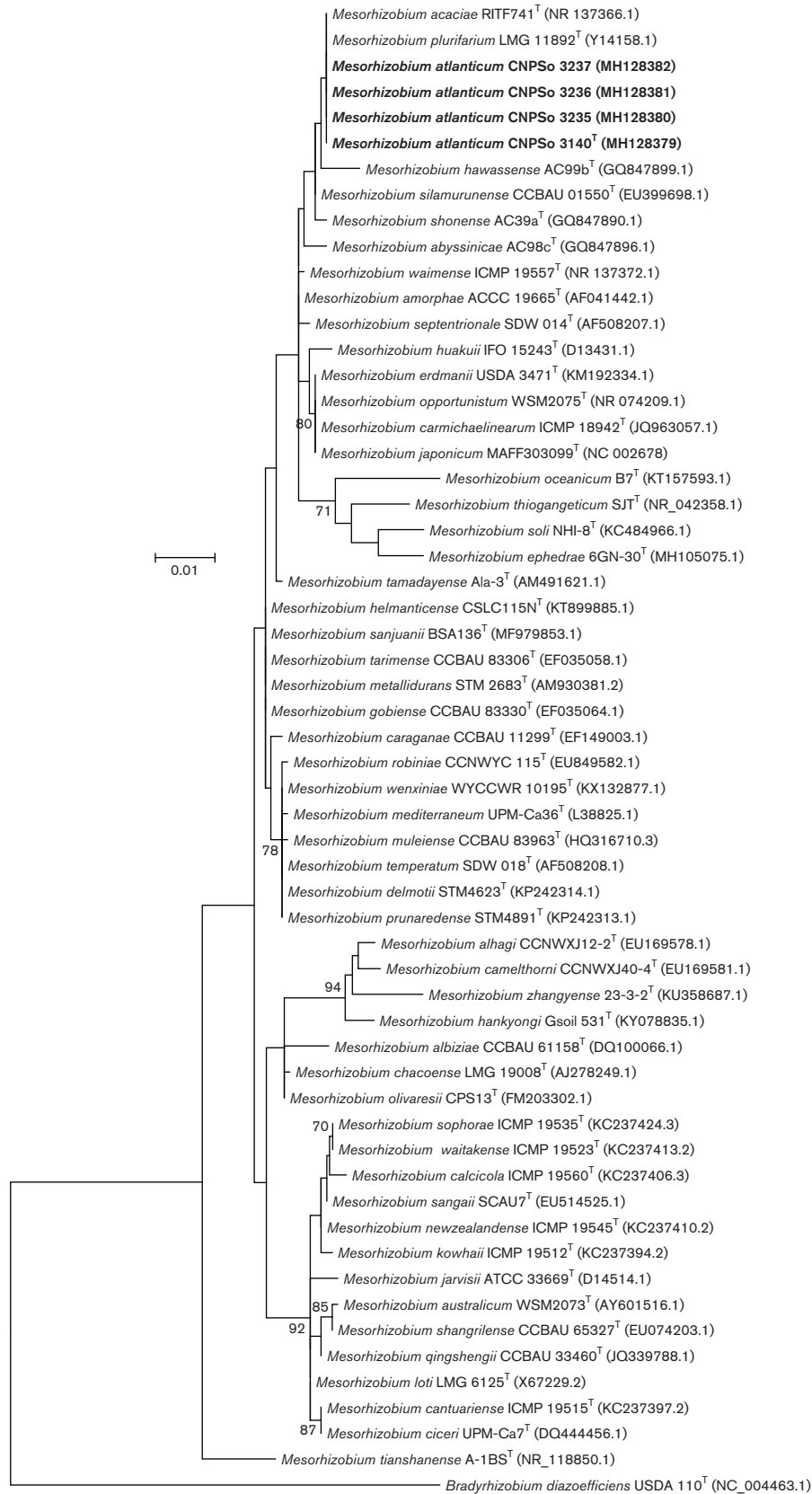


Fig. 1. Maximum-likelihood (ML) phylogeny based on a 1218 bp alignment of the 16S rRNA gene among novel *Mesorhizobium* strains and reference strains. Phylogeny was built with MEGA 7 using the ML statistical method and Tamura's three-parameter model.

Bootstrap support was based on 1000 pseudoreplicates and values are shown at nodes when percentages are $\geq 70\%$. Accession numbers are indicated within parentheses. *Mesorhizobium atlanticum* strains are displayed in bold. Bar indicates percentage of nucleotide substitutions.

776 796 bp; by using Rast and Quast, the genome was estimated at 6 536 078 bp. Average nucleotide identity (ANI) of whole genomes is becoming the gold standard in taxonomy to recognize novel species, with cited reference values of 95–96 % being equivalent to the 70 % DNA–DNA hybridization (DDH) threshold [16, 21–24]. ANI values were calculated using the ANI calculator [25], and all values found in our study were below the species circumscription threshold, of 89.75 % with *M. plurifarum* and of 88.83 % with *M. hawassense*, another indicative that CNPSo 3140^T represents a novel species.

Digital DDH (dDDH), another method that allows comparisons *in silico* between two genomes [26, 27], was calculated for the CNPSo 3140^T strain and *M. plurifarum* and *M. hawassense*. The values were estimated by GGDC version 2.1 using the recommended Formula 2 (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>), considering a cut-off value of 70 %, the same used for DDH. We found values of 39 % and 37.70 % with the closest species *M. plurifarum* and *M. hawassense*,

respectively, confirming that the CNPSo 3140^T strain belongs to a new species.

To determine the DNA G+C content, the genome contigs were concatenated and the proportion of G+C was calculated with Quast [28]. CNPSo 3140^T has a DNA G+C content of 63.7 mol%, which is within the range for species of the genus *Mesorhizobium* [29].

A BOX-PCR methodology using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 2 % tolerance was employed to evaluate the genetic profiles of the strains. The analysis showed similarity of 74 % between the strains, indicating that each strain was unique, and with less than 50 % similarity to close *Mesorhizobium* species (Fig. S1).

PHYSIOLOGY AND CHEMOTAXONOMY

Phenotypic features were determined for the *Mesorhizobium* strains and the closest *Mesorhizobium* species as

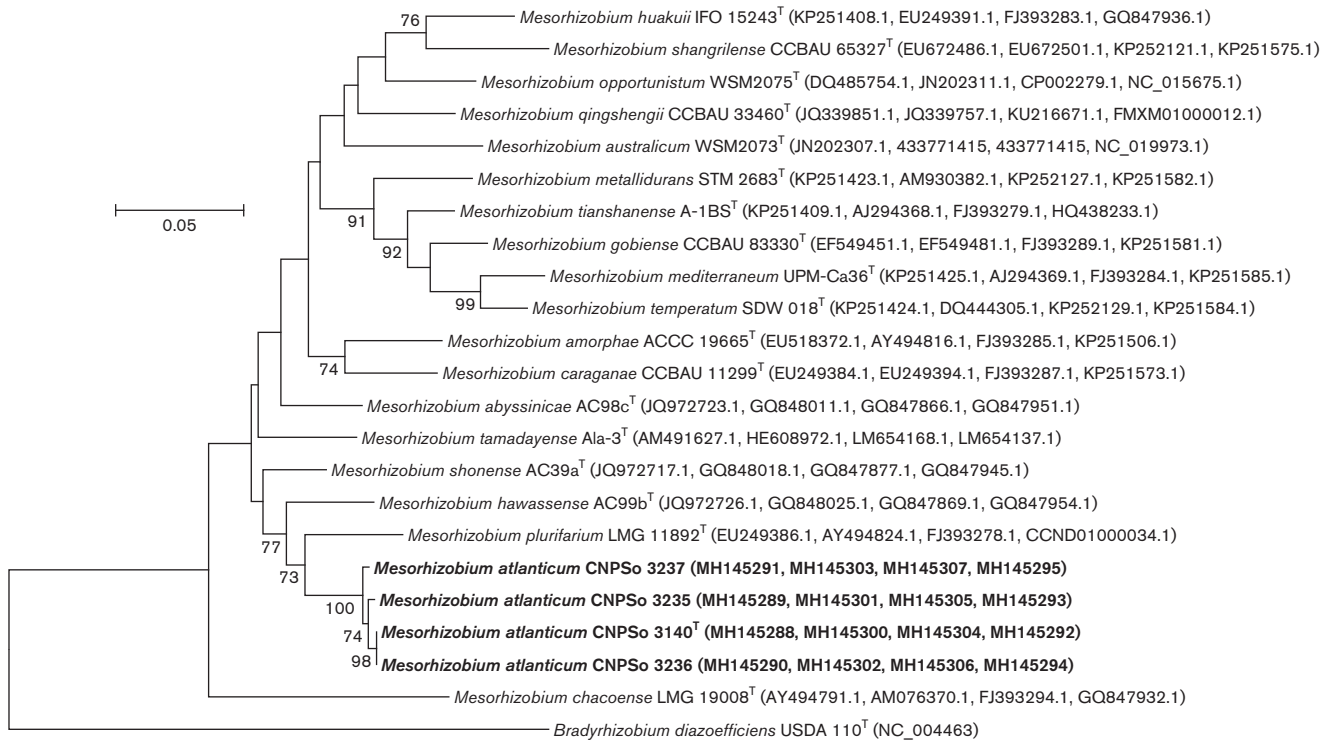


Fig. 2. Maximum-likelihood (ML) phylogeny based on a 1684 bp alignment of concatenated gene sequences (*glnII+recA+rpoB+gyrB*) among novel *Mesorhizobium* strains and reference strains. Phylogeny was built with MEGA 7 using the ML statistical method and Tamura’s three-parameter model. Bootstrap support was based on 1000 pseudoreplicates and values are shown at nodes when percentages are $\geq 70\%$. Accession numbers are indicated within parentheses. *Mesorhizobium atlanticum* strains are displayed in bold. Bar indicates percentage of nucleotide substitutions.

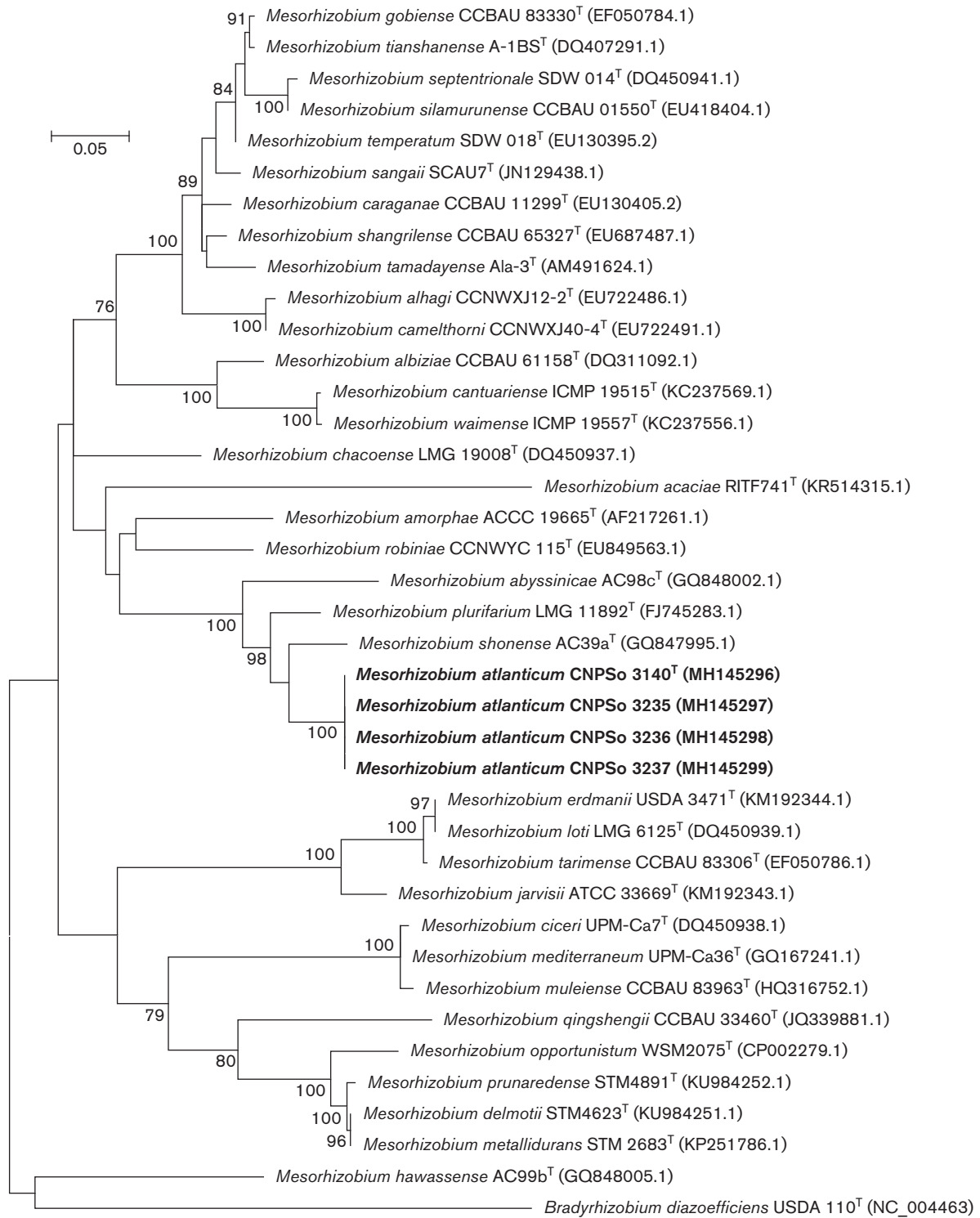


Fig. 3. Maximum-likelihood (ML) phylogeny based on a 348 bp alignment of *nodC* gene sequences among novel *Mesorhizobium* strains and reference strains. Phylogeny was built with MEGA 7 using the ML statistical method and Tamura's three-parameter model. Bootstrap support was based on 1000 pseudoreplicates and values are shown at nodes when percentages are $\geq 70\%$. Accession numbers are indicated within parentheses. *Mesorhizobium atlanticum* strains are displayed in bold. Bar indicates percentage of nucleotide substitutions.

described before [23]. Unless indicated, morpho-physiological tests were performed at 28 °C.

Cells of type strain CNPSo 3140^T were non-spore-forming rods producing small circular colonies with convex surfaces, which were slightly pink after 3 days of growth on modified-YMA medium containing Congo red as indicator [15]. Growth in distinct conditions of temperature and pH on modified-YMA medium showed that the novel strains were able to grow at 37 °C and with pH from 4 to 8. Acid/alkaline reaction was verified in modified-YMA medium with bromothymol blue. Salinity tolerance was determined in YMA medium supplemented with NaCl. All strains produced acid reaction and were tolerant of 1 % NaCl (Table S3). The ability of the strains to utilize different substrates as carbon sources was verified by using the API 50CH kit (bio-Mérieux), according to the manufacturer's instructions, with YM-minus-mannitol used as the basal medium. The substrate utilization was scored as no utilization, weak utilization or good utilization (Table S3).

In general, the novel strains differed from other *Mesorhizobium* species primarily in relation to growth at 37 °C, tolerance to 1 % NaCl, and carbon source utilization.

The profiles of fatty acids were determined using the MIDI Sherlock Microbial Identification System [30] with the TSBA6 database [16]. The analysis revealed that the major fatty acids in CNPSo 3140^T were summed feature 8 (C_{18:1} ω_{6c}/C_{18:1} ω_{7c}); in smaller proportions were found C_{16:0} and C_{19:0} cyclo ω_{8c} (Table S4). *M. plurifarium*, *M. shonense* and *M. hawassense* also exhibited, in different proportions, the major fatty acids C_{16:0} and summed feature 8 (Table S4).

Resistance to antibiotics was evaluated using the disc diffusion method on YMA plates with the following antibiotics: ampicillin, bacitracin, cefuroxime, chloramphenicol, nalidixic acid, neomycin, penicillin G, tetracycline, streptomycin and erythromycin. All tests were performed in duplicate. Only the most significant results are shown in Table S3.

After compiling different genotypic, phenotypic and phylogenetic data in a polyphasic approach, our results point out to the existence of a new species of *Mesorhizobium*, for which the name *Mesorhizobium atlanticum* is proposed, with CNPSo 3140^T nominated as the type strain.

DESCRIPTION OF MESORHIZOBIMUM ATLANTICUM SP. NOV.

Mesorhizobium atlanticum (at.lan'ti.cum. L. neut. adj. atlanticum pertaining to the Atlantic forest of Brazil).

Cells are Gram-stain-negative, non-spore-forming rods. Colonies are less than 1 mm in diameter, circular, convex, opaque, with low production of mucus, and slightly pink when grown in modified-YMA medium containing Congo red after 3 days of growth at 28 °C. All strains produce an acid reaction in modified-YMA with bromothymol blue. The strains grow at pH 4 and 8, with optimum growth at

pH 6.8. They grow optimally at 28 °C, are able to grow at 37 °C and in the presence of 1 % NaCl. In general, the strains utilize the carbohydrates glycerol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl α-D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, arbutin, aesculin iron citrate, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, melezitose, raffinose, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol and potassium 2-ketogluconate. They weakly use methyl β-D-xylopyranoside, L-arabitol, potassium gluconate and potassium 5-ketogluconate; and they do not use erythritol, methyl α-D-mannopyranoside and amygdalin. The strains show intrinsic resistance to the antibiotics (per disc) erythromycin (15 μg) and bacitracin (0.04 U), are moderately sensitive to nalidixic acid (30 μg), and sensitive to penicillin (10 U), cefuroxime (30 μg), ampicillin (10 μg), chloramphenicol (30 μg), erythromycin (15 μg), tetracycline (30 μg) and streptomycin (10 μg).

The type strain is CNPSo 3140^T (=ABIP 206^T=LMG 30305^T=U1602^T), isolated from an effective nitrogen-fixing nodule of *Phaseolus vulgaris*, which was used to trap rhizobia from a soil of the Atlantic Forest biome. Its genomic DNA G+C content is 63.7 mol%.

The following new sequences have been deposited in GenBank/EMBL/DDBJ: *glnII* of CNPSo 3140^T (MH145288), CNPSo 3235 (MH145289), CNPSo 3236 (MH145290), CNPSo 3237 (MH145291); *recA* of CNPSo 3140^T (MH145300), CNPSo 3235 (MH145301), CNPSo 3236 (MH145302), CNPSo 3237 (MH145303); *rpoB* of CNPSo 3140^T (MH145304), CNPSo 3235 (MH145305), CNPSo 3236 (MH145306), CNPSo 3237 (MH145307); *gyrB* of CNPSo 3140^T (MH145292), CNPSo 3235 (MH145293), CNPSo 3236 (MH145294), CNPSo 3237 (MH145295); 16S rRNA of CNPSo 3140^T (MH128379), CNPSo 3235 (MH128380), CNPSo 3236 (MH128381), CNPSo 3237 (MH128382); *nodC* of CNPSo 3140^T (MH145296), CNPSo 3235 (MH145297), CNPSo 3236 (MH145298), CNPSo 3237 (MH145299).

Funding information

Funded by INCT-Plant-Growth Promoting Microorganisms for Agricultural Sustainability and Environmental Responsibility (CNPq 465133/2014-2, Fundação Araucária-STI, CAPES), Embrapa (02.13.08.001.00.00), CNPq-Universal (400468/2016-6), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001).

Acknowledgements

L.C.R.H. and R.F.D.A. acknowledge PhD fellowships from CAPES (Código de Financiamento 001) and J.R.M.D. fellowships from CNPq (Brazilian National Research Council). Authors acknowledge Itamar S. Melo and Juliane Fontana (Embrapa Meio Ambiente) for help with the fatty acids analyses, and Ligia Maria O. Chueire (Embrapa Soja) for help in several steps of this study.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Hungria M, Vargas MAT, Suhet AR, Peres JRR. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: Araujo RS, Hungria M (editors). *Microorganismos de Importância Agrícola*. Brasília: Embrapa-Spi; 1994. pp. 9–89.
- Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martínez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Rosenberg E (editor). *The Prokaryotes – Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013. pp. 427–451.
- de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:369–382.
- Wang ET, van Berkum P, Sui XH, Beyene D, Chen WX et al. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:51–65.
- Wang ET, Kan FL, Tan ZY, Toledo I, Chen WX et al. Diverse *Mesorhizobium plurifarium* populations native to Mexican soils. *Arch Microbiol* 2003;180:444–454.
- Guan SH, Chen WF, Wang ET, Lu YL, Yan XR et al. *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2646–2653.
- Nandasena KG, O'Hara GW, Tiwari RP, Willems A, Howieson JG. *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:2140–2147.
- Zhou PF, Chen WM, Wei GH. *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60:2552–2556.
- Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, Young JP, Wei GH. *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:574–579.
- Zheng WT, Li Y, Wang R, Sui XH, Zhang XX et al. *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:2002–2007.
- de Meyer SE, Tan HW, Andrews M, Heenan PB, Willems A. *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhailii* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:786–795.
- dall'agnol RF, Bournaud C, Farias SM, Béna G, Moulin L 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 Microbiol Ecol* 2017;93:1–15.
- Bomfeti CA, Florentino LA, Guimarães AP, Cardoso PG, Guerreiro MC et al. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. *R Bras C Solo* 2011;35:657–671.
- Laranjo M, Oliveira S. Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011; 99:651–662.
- Hungria M, O'Hara GW, Zilli JE, Araujo RS, Deaker R et al. Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson JG and Dilworth MJ (editors). *Working with Rhizobia*. Canberra, Australia: ACIAR; 2016. pp. 39–60.
- Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E et al. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63: 3342–3351.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870–1874.
- Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol* 1992;9:678–687.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792–1797.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
- Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Parma MM, Melo IS et al. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4424–4433.
- 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.
- Helene LCF, Delamuta JRM, Ribeiro RA, Hungria M. *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:1827–1834.
- Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19126–19131.
- Rodríguez-R LM, Konstantinidis KT. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Prepr* 2016;2016.
- Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Göker M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:352–356.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013;14: 60.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29: 1072–1075.
- Jarvis BDW, van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:895–898.
- MIDI. *Sherlock Microbial Identification System Operating Manual*, version 4.0. Newark, DE: MIDI, Inc; 2001.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

- The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
- We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
- Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
- 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
- Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

Supplementary Material

5 ***Mesorhizobium atlanticum* sp. nov., a new nitrogen-fixing species from**

6 **soils of the Brazilian Atlantic Forest biome**

8 Luisa Caroline Ferraz Helene, Rebeca Fuzinato Dall’Agnol, Jakeline Renata Marçon
9 Delamuta, and Mariangela Hungria

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

Table S1. Strains used in this study.

<i>Mesorhizobium</i> STRAINS	SYNONYMOUS	*TRAP-HOST PLANT	REFERENCE
CNPSo 3140 ^T	ABIP 206 ^T , LMG 30305 ^T , U1602 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall'Agnol <i>et al.</i> (2017)
CNPSo 3235	STM 10942	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall'Agnol <i>et al.</i> (2017)
CNPSo 3236	STM 10687	<i>Mimosa pudica</i>	Dall'Agnol <i>et al.</i> (2017)
CNPSo 3237	STM 11005	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall'Agnol <i>et al.</i> (2017)

*Strains were isolated from plants inoculated with soils of Rio de Janeiro State (Atlantic Forest biome), Brazil

Dall'Agnol RF, Bournaud C, Farias SM, Béna G, Moulin L *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 Microbiol Ecol* 2017;93:1-15.

Table S2. Nucleotide identity (NI) between *Mesorhizobium atlanticum* CNPSo 3140^T, CNPSo 3235, CNPSo 3236 and CNPSo 3237 strains and type strains of related *Mesorhizobium* species based on the sequences of the 16S rRNA and of the concatenated housekeeping genes (*glnII*+*recA*+*rpoB*+*gyrB*).

Species	Gene	
	16S rRNA	MLSA (<i>glnII</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i>)
Within <i>M. atlanticum</i>	100	99.1-100
Between <i>M. atlanticum</i> strains and:		
<i>M. plurifarium</i> LMG 11892 ^T	100	93.9
<i>M. shonense</i> AC39a ^T	99.5	94.4-94.5
<i>M. hawassense</i> AC99b ^T	99	93.9-94
<i>M. acaciae</i> RITF741 ^T	100	ND
<i>M. silamurunense</i> CCBAU 01550 ^T	99.8	ND
<i>M. abyssinicae</i> AC98c ^T	99.3	92.7-92.8
<i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T	99.4	91-91.1
<i>M. australicum</i> WSM2073 ^T	97.7	89.4-89.7
<i>M. caraganae</i> CCBAU 11299 ^T	98.6	91.2
<i>M. gobiense</i> CCBAU 83330 ^T	98.9	90.6-90.8
<i>M. chacoense</i> LMG 19008 ^T	98.6	87.1-87.2
<i>M. huakuii</i> IFO 15243 ^T	99	90.7
<i>M. mediterraneum</i> UPM-Ca36 ^T	98.5	89.7-90
<i>M. metallidurans</i> STM 2683 ^T	98.9	90.5-90.6
<i>M. opportunistum</i> WSM2075 ^T	99.3	91.4-91.5
<i>M. qingshengii</i> CCBAU 33460 ^T	97.9	90.6-90.8
<i>M. shangrilense</i> CCBAU 65327 ^T	97.8	89.7-89.9
<i>M. tamadayense</i> Ala-3 ^T	98.9	93-93.1
<i>M. temperatum</i> SDW 018 ^T	98.6	90.2-90.4
<i>M. tianshanense</i> A-1BS ^T	97.2	90.3-90.5

Table S3. Distinctive morpho-physiological features of *Mesorhizobium atlanticum* strains and related species. 1. *M. atlanticum* CNPSo 3140^T, 2. *M. atlanticum* CNPSo 3235; 3. *M. atlanticum* CNPSo 3236; 4. *M. atlanticum* CNPSo 3237; 5. *M. plurifarum* LMG 11892^T; 6. *M. shonense* AC39a^T; *M. hawassense* AC99b^T. Data represent the means of two biological replicates. +, growth; -, no growth; W weakly positive.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Carbon source utilization*							
Erythritol	-	-	-	-	-	-	+
Methyl-βD-xylopyranoside	w	w	w	w	w	-	w
Dulcitol	+	+	+	+	-	+	+
Methyl-αD-glucopyranoside	+	+	w	+	w	w	w
N-acetylglucosamine	+	+	+	+	w	+	+
Amygdalin	-	-	+	+	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	w	+	w
Salicin	+	+	+	+	w	+	+
D-lactose	+	w	+	+	+	+	+
Inulin	w	-	+	+	-	-	-
D-melezitose	w	-	+	+	-	-	-
D-raffinose	+	+	+	+	w	+	+
D-tagatose	+	+	+	+	-	+	+
L-arabitol	w	w	w	-	w	+	+
Potassium Gluconate	w	-	w	-	-	+	+
Potassium 2-Ketogluconate	+	+	+	+	-	+	+
Potassium 5-Ketogluconate	w	-	w	-	-	+	+
Growth at:							
pH 4,0	+	+	+	+	+	w	+
37°C	+	+	+	+	+	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	-	-
Resistance to (µg per disc)							
Nalidixic acid (30)	w	w	w	w	-	-	-

* Carbon source utilization was evaluated with the API 50CH kit (bioMérieux)

Table S4. Fatty acid profile of *Mesorhizobium atlanticum* CNPSo 3140^T and the closest reference type strains. Strains were grown for 5 days at 28 °C on yeast extract-mannitol agar plates. Data obtained with the MIDI system using FAME library TSBA6. Strains: 1. *M. atlanticum* CNPSo 3140^T, 2. *M. plurifarum* LMG 11892^T, 3. *M. shonense* AC39a^T, 4. *M. hawassense* AC99b^T.

Fatty acid	1	2	3	4
C16:0	14.92	15.90	19.76	16.81
C17:0 iso		5.66		
C18:0		4.65	6.46	
C19:0 cyclo ω8c	6.62	20.85	13.59	
Summed features				
8*	78.46	52.94	60.19	83.19

* Summed feature 8= C18:1ω6c/C18:1ω7c

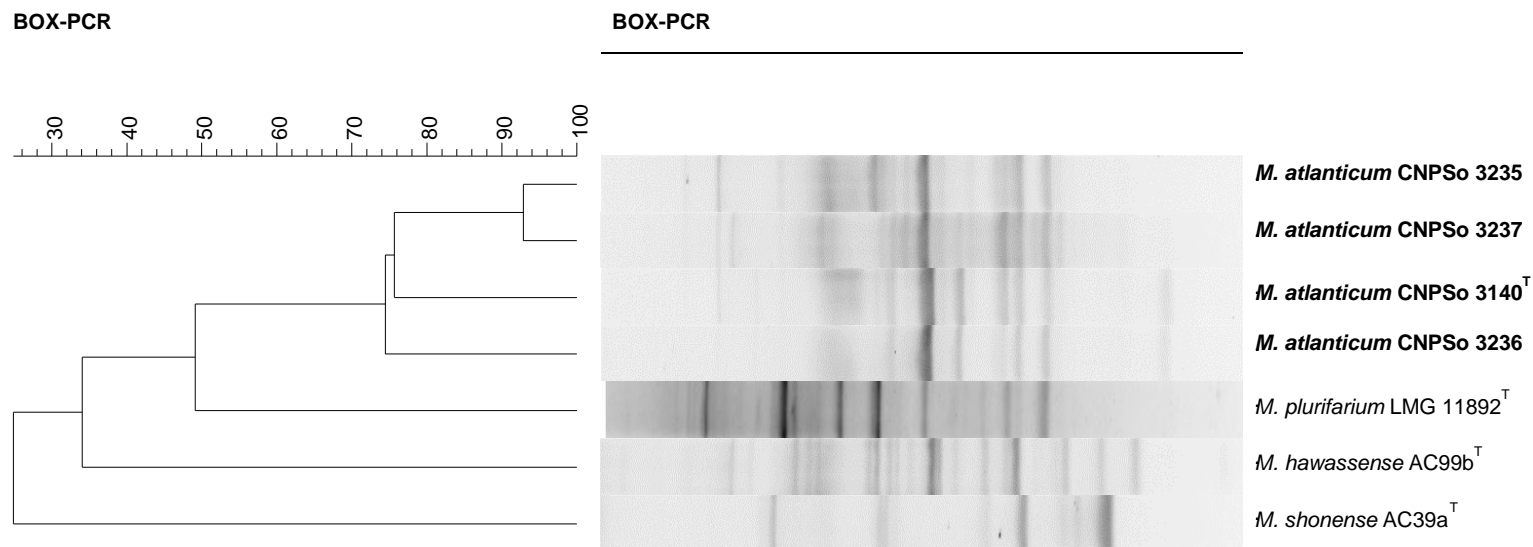


Figure S1. Cluster analysis of BOX-A1R-PCR products obtained from novel *Mesorhizobium* and related species. Analysis was performed in Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6) using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) and the Jaccard coefficient at 2% tolerance. *Mesorhizobium atlanticum* strains are displayed in bold.

8 ESTUDO 3

Caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* indígenas da Austrália Ocidental e África do Sul indica notável diversidade genética e revela putativas espécies novas.

Bradyrhizobium são fixadores de N₂ microsimbiontes de leguminosas com aplicações relevantes na sustentabilidade da agricultura. Neste estudo, foram investigadas as relações filogenéticas de genes conservados e simbióticos de 21 estirpes do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de diferentes leguminosas na Austrália Ocidental e África do Sul. A filogenia do gene 16S rRNA dividiu as estirpes em dois superclados, de *B. japonicum* e *B. elkanii*, porém com baixa discriminação entre as espécies. A análise das sequências de multilocus (MLSA) com quatro genes conservados que codificam proteínas essenciais ao funcionamento das células (*dnaK*, *glnII*, *gyrB* e *recA*) apontou sete grupos como possíveis espécies novas, dois pertencendo ao superclado de *B. japonicum* e cinco do superclado de *B. elkanii*. As onze linhagens restantes apresentaram maior similaridade com seis espécies, *B. lupini*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. subterraneum*, *B. brasilense* e *B. retamae*. A análise filogenética do gene simbiótico *nodC* agrupou 13 estirpes em três diferentes simbiovares (sv. *vignae*, sv. *genistearum* e sv. *retamae*), enquanto as outras sete podem compor simbiovares novos. O perfil genético das estirpes avaliadas por BOX-PCR revelou alta diversidade intra e interespecífica. Os resultados apontam que existe um alto nível de diversidade a ser explorado no gênero *Bradyrhizobium*, e novos estudos podem confirmar e caracterizar as novas espécies e simbiovares.

Palavras-chave: MLSA, diversidade filogenética, taxonomia, fixação biológica do nitrogênio, nodulação.

HELENE, L. C. F.; O'HARA, G. W.; HUNGRIA, M. Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species. (To be submitted).

Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species

Luisa Caroline Ferraz Helene, Graham O'Hara, Mariangela Hungria.

Abstract

Bradyrhizobium are N₂-fixing microsymbionts of legumes with relevant applications in agricultural sustainability. In this study, the phylogenetic relationships of conserved and symbiotic genes of 21 *Bradyrhizobium* strains isolated from nodules of different legume plants in Western Australia and South Africa were investigated. The 16S rRNA phylogeny divided the strains in two superclades, of *B. japonicum* and *B. elkanii*, but with low discrimination among the species. The multilocus sequence analysis (MLSA) with four protein-coding housekeeping genes (*dnaK*, *glnII*, *gyrB* and *recA*) pointed out seven groups as putative new species, two within the *B. japonicum*, and five within the *B. elkanii* superclades. The remaining eleven strains showed higher similarity with six species, *B. lupini*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. subterraneum*, *B. brasilense* and *B. retamae*. Phylogenetic analysis of the *nodC* symbiotic gene clustered 13 strains in three different symbiovars (sv. *vignae*, sv. *genistearum* and sv. *retamae*), while seven others might compose new symbiovars. The genetic profile of the strains evaluated by BOX-PCR revealed high intra- and interspecific diversity. The results point out the high level of diversity still to be explored within the *Bradyrhizobium* genus, and further studies might confirm new species and symbiovars.

Keywords: Multilocus sequence analysis, Phylogenetic diversity, Taxonomy, Biological nitrogen fixation, Nodulation.

Introduction

Biological nitrogen fixation (BNF) positively impact agriculture, and the most relevant organisms involved are the symbiotic diazotrophic bacteria known as rhizobia, which can associate with a broad range of legumes, with the formation of specific organs, the nodules, where the process takes place (Herridge et al., 2008). The *Bradyrhizobium* genus is considered as a probable ancestor lineage of all rhizobia (Lloret et al., 2005; Hungria et al., 2015) and includes microsymbionts of legumes used as forage, green manure, grains and wood production, being reported as the predominant group of nodulating bacteria of several legumes across the planet (Parker, 2015). Therefore, research should target the improvement of the BNF process, including the characterization of *Bradyrhizobium* diversity (Hungria et al., 2015; Grönemeyer et al., 2018; Jaiswal and Dakora, 2019).

The *Bradyrhizobium* genus is geographically widespread, and its members have been isolated from several countries and different edaphoclimatic conditions. It is also known that some strains were spread through the continents due to the application of agricultural inoculants, carried by seeds or plants (Stepkowski et al., 2005; Vinuesa et al., 2008; Rodríguez-Echeverría et al., 2011; Hungria et al., 2015). Some regions of Western Australia and South Africa are agricultural areas of legumes cultivation used mainly for stock feed, such as lupines (*Lupinus* spp.) and serradella (*Ornithopus sativus* Brot.); however, soils from these two regions did not contain indigenous rhizobia able to effectively associate with these legumes and the inoculation was first required for their successful cultivation (Stepkowski et al., 2005). Contrastingly, the dominating rhizobial populations later found in both regions were of different strains from those

used in commercial inoculants (Strijdom, 1998; Botha et al., 2002). Therefore, the search for strains from these regions with high capacity of nitrogen fixation should be encouraged.

In 1982 the rhizobia classified as *Rhizobium japonicum* were reclassified in the new genus *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), but its taxonomy remains complex. First, *B. japonicum* was the only described species, including the microsymbionts of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), with no species status recognized for the remaining strains (Jordan, 1982; Avontuur et al., 2019). Following, the soybean microsymbionts were split in two species, with the description of *B. elkanii* for the second group of strains (Kuykendall et al., 1992). However, the diversity within the genus was little explored, mainly due to the high level of conservation of the 16S rRNA gene sequences, routinely used as molecular marker for species discrimination (van Berkum et al., 2000). After that, great progress have been achieved based on studies using other molecular techniques such as the analysis of housekeeping genes sequences and genomes comparisons (e.g. Rivas et al., 2009; Chun and Rainey, 2014; Helene et al., 2015, 2017; Delamuta et al., 2016; Costa et al., 2018) resulting in the description of 53 *Bradyrhizobium* species so far, of which 39 have been validated (Parte, 2018). Even so, diversity studies suggest that several strains might represent new species (Reeve et al., 2015; Avontuur et al., 2019).

The elucidation of symbiotic properties of rhizobial strains are of great importance to explore their biotechnological potential (Guimarães et al., 2015; Helene et al., 2017); in addition, investigation on the diversity of the symbionts may provide massive strain resources for the development of commercial inoculants with bacteria adapted to local conditions. (Grönemeyer et al., 2018). In order to access the genetic and symbiotic diversity of *Bradyrhizobium* strains from Western Australian and South

African soils, we isolated and analyzed the genomic profiles and the phylogenetic relationships of 21 strains.

Materials and Methods

Strains and isolation process

A total of 21 strains were used in this study and are listed in Table 1. They included 11 Western Australian strains from the WSM Culture Collection (Western Australian Soil Microbiology Gene Bank) (Table 1, in bold), isolated in a previous study (Yates et al., 2004) from nodules of indigenous legumes and identified as putative members of the *Bradyrhizobium* genus, based on the properties of slow growth and alkaline reaction in YM-modified medium (Hungria et al., 2016). Three South African strains (WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400) were isolated from *Glycine* sp., a forage for cattle feeding, growing in Stutterheim, Eastern Cape, South Africa. The WSM strains were recovered from ampoules stored at the WSM Culture Collection on modified-YMA medium with Congo red (0.00125%) at the Murdoch University, Perth, Western Australia.

The remaining nine strains, designated as CNPSo, were trapped, isolated, purified and identified in this study, from nodules of different legumes grown in Australia (Table 1); the isolation sites of all strains are indicated in the supplementary Fig. S1. The seeds were surface-sterilized and sown in pots containing soil samples collected in Western Australia. After 25 days the plants were harvested and the nodules

removed, surface sterilized and aseptically crushed over modified-YMA medium, as described before (Hungria et al., 2016). Cultures were sequentially striated in the same medium until obtaining pure colonies.

Culture sources were maintained in cold room at 4 °C and long-term storage was by cryopreservation in modified-YM broth with 30 % glycerol at -80 °C and -150 °C and also lyophilized. All 21 strains are deposited at the “Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja” (WFCC Collection # 1213, WDCM Collection # 1054), in Londrina, State of Paraná, Brazil. The fourteen WSM strains are also deposited at the “Western Australian Soil Microbiology (WSM) Culture Collection”, at the Centre for *Rhizobium* Studies, Murdoch University, Perth, Western Australia.

DNA extraction, genes amplification and sequencing

For DNA analysis the strains had their genomic DNA extracted using the FavorPrep Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen), according to the manufacturer’s procedure. DNA quality was verified by electrophoresis at 70 V for 30 min on 1 % agarose gels stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. The primers and PCR cycles used for the amplification of the 16S rRNA, of the four housekeeping genes (*dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA*), and of the symbiotic *nodC* gene are listed in the supplementary Table S1. The PCR products were purified using PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen), according to the manufacturer’s procedure. The concentration of the PCR products was verified by electrophoresis as described above, and the samples stored at -20 °C for further analysis. Sequencing was

performed on an ABI3500xL genetic analyzer (Applied Biosystems), as described before (Delamuta et al., 2017). Sequences of the type strains were retrieved from the GenBank database, except for the 16S rRNA sequence of *Bradyrhizobium shewense* ERR11^T, that was retrieved from the Joint Genome Portal (JGI). Sequences obtained in this study were submitted to the GenBank database and the accession numbers are shown in bold on the trees and in the supplementary Table S2.

Phylogenetic analysis

Multiple sequences alignments were performed with MUSCLE (Edgar, 2004) and the phylogenetic trees were built with the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (version 7) (Kumar et al., 2016). All positions containing gaps and missing data were eliminated by the program to build the phylogenetic trees, and the number of positions in the final dataset is indicated in the supplementary Table S3. The phylogenetic information related to each gene was accessed by calculating the percentage of conserved, variable and informative sites of the alignments, also with MEGA v.7. The best model of evolution was determined considering the lowest Bayesian Information Criterion (BIC) score (Schwarz, 1978). The maximum likelihood (ML) algorithm (Felsenstein, 1981) was used to build the phylogenetic trees, supported by bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 1,000 replicates. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as outgroup. Each of the four housekeeping genes (*dnaK*, *glnII*, *gyrB* and *recA*) was trimmed to the same length, and then concatenated for the multilocus sequence analysis (MLSA) with the strains from this study, in addition to

type strains. Nucleotide identities (NI) were calculated using the Bioedit software (version 7.2.5).

rep-PCR genomic fingerprinting

For the genomic fingerprinting by rep-PCR, the genomic DNAs were extracted using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's procedure. DNA quality was verified by electrophoresis, as described in the DNA extraction and genes sequencing section. DNA was amplified using the primer BOX-A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') and amplification cycles of 7 min a 95 °C, 30x (1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C, 8 min a 65 °C), 16 min a 65 °C, as described before (Kaschuk et al., 2006), except the number of cycles which was changed from 35 to 30 times. The fragments were separated by electrophoresis in 1.5 % agarose gel at 120 V for 5 h, and using 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) as molecular marker. The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The dendrogram was built with Bionumerics software (version 7.6) using the UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) algorithm (Sneath and Sokal, 1973) and the Jaccard coefficient (Jaccard, 1912), with 1 % tolerance. The level of 70 % similarity was adopted in the cluster analysis, according to previous studies on rhizobial diversity (Menna et al., 2009b).

Results

16S rRNA phylogeny

Based on the analysis of the 16S rRNA gene, the 21 strains were confirmed as belonging to the *Bradyrhizobium* genus. The 16S rRNA sequences alignment included 896 nucleotides, comprising 8.2 % variable, 90.8 % conservative, and 4.6 % parsimony informative sites (Table S3). The nucleotide identity (NI) of the *Bradyrhizobium* 16S rRNA sequences ranged from 95.6 to 100 % among all strains from this study, and from 95.0 to 100 % when comparing with 53 *Bradyrhizobium* species (data not shown); Table 2 shows the NI values with the closest species identified in the MLSA.

The 16S rRNA phylogeny did not reveal a clear distinction among the species, but split the strains in the well-known superclades, with seven strains clustering within the *B. japonicum* (GI) and 14 within the *B. elkanii* (GII) superclades; the strains were divided in ten major subgroups (Fig. 1). Subgroup GI.I clustered strain CNPSo 4027 with *B. canariense* and *B. lupini*, whereas subgroup GI.II clustered strain CNPSo 4019 with five species: *B. americanum*, *B. centrosemae*, *B. daqingense*, *B. guangxiense* and *B. liaoningense*. Strain WSM 1743 was clustered with *B. forestalis* and *B. subterraneum* in subgroup GI.III, sharing 99.6 and 100 % of NI, respectively (Fig. 1, Table 2). Subgroup GI.IV included strains CNPSo 4017, CNPSo 4016, CNPSo 4010 and CNPSo 4011, clustered with *B. yuanmingense* and *B. vignae*. Subgroup GII.I clustered the strains WSM 1744, WSM 1790, WSM 1737 and WSM 1736 with *B. retamae*, and GII.III clustered strains WSM 1742 and WSM 1791 with *B. valentinum* (Fig. 1). Strain CNPSo 4026 clustered in the same group of *B. neotropicale* and *B. centrolonii*, while WSM 1704 clustered with ten species in subgroup GII.VI, *B. ripae*, *B. embrapense*, *B. erythrophlei*, *B. icense*, *B. viridifuturi*, *B. lablabi*, *B. mercantei*, *B. namibiense*, *B.*

pachyrhizi and *B. paxllaeri*. Six strains clustered in two distinct subgroups from all described *Bradyrhizobium* species: subgroup GII.II with strains WSM 1735 and WSM 1741, and subgroup GII.V clustering WSM 1738 with the three South African strains, WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400, and within both subgroups sharing 100 % NI with each other.

Housekeeping genes phylogeny

The phylogenetic relationships among the 21 strains from this study and *Bradyrhizobium* species previously described were also investigated with the partial sequences of four housekeeping genes. The genes and sequences lengths analyzed included: *dnaK* (221 bp), *glnII* (505 bp), *gyrB* (562 bp) and *recA* (375 bp). These genes are involved in fundamental cell functions encoding the conserved Hsp70 class chaperone, glutamine synthase II, DNA gyrase subunit B, and recombinase A protein, respectively. Individual phylogenetic trees were built with each housekeeping gene and are shown as supplementary material (Figs. S2 to S5).

The percentages of conserved, variable and informative sites, and the estimated frequency of T, C, A, G nucleotides are shown in Table S3. Among the housekeeping genes, *gyrB* had the lowest level of conservation and the greatest level of parsimony informative sites, comprising 237 variable (42.2 %), 315 conserved (56.0 %), and 185 parsimony informative sites (32.9 %), while *recA* had 140 variable (37.3 %), 235 conserved (62.7 %), and 119 parsimony informative sites (31.7 %), being the most conserved sequence, but presenting higher parsimony informative level than the *dnaK* gene, which had 68 parsimony informative sites (30.8 %) (Table S3). In general, the

individual gene phylograms were congruent among the four genes (Figs. S2 to S5) and with the 16S rRNA phylogeny (Fig. 1).

MLSA phylogeny

In the MLSA analysis the concatenated sequences included 1,650 nucleotides, comprising 657 variable (39.5 %), 996 conserved (59.9 %), and 530 parsimony informative sites (31.9 %) (Table S3). The NI of the concatenated sequences ranged from 87.3 to 100 % among the strains from this study, and from 86.2 to 99.1 % in comparison with 49 *Bradyrhizobium* species (data not shown).

As in the 16S rRNA (Fig. 1), the housekeeping concatenated sequences phylogeny split the genus in two superclades, GI and GII (Fig. 2); however, *B. denitrificans* and *B. oligotrophicum* clustered in a well-supported distinct group. Strains from this study were separated in six distinct subgroups in superclade GI and seven distinct subgroups in superclade GII. The subgroups were divided accordingly to the NI among related species, considering the delineation threshold of 97 % NI for *Bradyrhizobium* proposed by Durán et al. (2014). The only exception was subgroup GII.I, that was separated from close related species even sharing more than 97 % NI. We chose to split this group clustering strains WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400 even sharing more than 97 % NI with three distinct species, *B. brasilense*, *B. pachyrhizi* and *B. elkanii* (Fig. 2), because the NI does not have an evolutionary parameter, just mathematic similarity.

Seven strains from this study joined with 28 *Bradyrhizobium* species in the first group (GI), with bootstrap support of 99 %. Strain CNPSo 4027 was closely related to *B. canariense* in subgroup GI.I, sharing 98 % of NI, while CNPSo 4019 clustered with *B. liaoningense* in subgroup GI.II, with 97.2 % of NI. Considering the threshold of 97 %, subgroups GI.III and GI.IV had each a single strain, CNPSo 4016 and CNPSo 4010 (Fig. 2), respectively, and were clustered in the same branch, sharing 96.9 % NI with each other (Table 2). This branch joined subgroup GI.V, sharing less than 95.7 % of NI. Subgroup GI.V clustered strains CNPSo 4011 and 4017 sharing 98.4 % NI with each other, and 98.1-98.2 % with *B. yuanmingense*. Finally, strain WSM 1743 clustered with *B. subterraneum* in subgroup GI.VI, sharing 99.1 % of NI (Fig. 2, Table 2).

It is worth mentioning that in the 16S rRNA (Fig. 1), *glnII* (Fig. S3), and *recA* (Fig. S5) phylogenies, strain CNPSo 4027 clustered with *B. lupini* USDA 3051^T; however, this species was not included in the MLSA because it does not have the *dnaK* sequence available and the *gyrB* sequence aligned only few nucleotides with the other sequences, less than 200 bp. Therefore, to clarify the phylogenetic relationship between CNPSo 4027 and the related species *B. lupini* and *B. canariense*, a distinct phylogenetic tree was built (Fig. S6). This analysis was based on the concatenated sequence of the *glnII* (505 pb), *gyrB* (171 pb) and *recA* (375 pb) housekeeping genes of the 13 closest related species to the strain CNPSo 4027, according to the 16S rRNA phylogeny. In this analysis, CNPSo 4027 shared 99.4 % NI with *B. lupini* USDA 3051^T and 97.8 % NI with *B. canariense* LMG 22265^T (data not shown).

The second group (GII) clustered 19 species with 14 strains from this study (Fig. 2). The subgroup GII.I clustered the three South African strains, WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400, sharing 100 % of NI with each other, 98.7 % with *B. brasilense* and 98.0 % with *B. pachyrhizi* (Table 2). Subgroups GII.II and GII.III had a single

strain each, WSM 1704 and CNPSo 4026, sharing 94.6 % and 89.8 % of NI with the closest species *B. pachyrhizi* and *B. erythrophlei*, respectively. Subgroup GII.IV clustered strains WSM 1736 and WSM 1737 with 100 % NI, and strain WSM 1744, sharing 99.3 % NI; this subgroup shares 94.0-94.1 % NI with the closest related species *B. namibiense*. Subgroup GII.V also consisted of a single strain, WSM 1738, sharing 93.3 % NI with *B. namibiense*. Subgroup GII.VI clustered strains WSM 1742 and WSM 1791 with 100 % NI, and sharing 94.8 % with *B. icense*. Strains WSM 1790, WSM 1735 and WSM 1741 grouped with *B. retamae* in subgroup GII.VII, showing 97.0-97.3 % of NI with this species (Fig. 2, Table 2).

nodC phylogeny

The *nodC* phylogeny was built based on the partial sequences with 381 nucleotide positions, comprising 59.0 % variable, 40.9 % conservative, and 55.1 % parsimony informative sites (Table S3). With the primers used in this study, we were not able to amplify the symbiotic gene from strain WSM 1704. The phylogram showed that three strains, CNPSo 4017, CNPSo 4016, and CNPSo 4026, occupied isolated positions (Fig. 3) sharing less than 92.6 % NI with other species (Table S4). Strain CNPSo 4011 clustered with *B. liaoningense* CCBAU 33113 with 100 % NI, and the closest related species was *B. yuanmingense*, sharing 94.4 % NI. Strains CNPSo 4010 and WSM 1743 clustered in the same together, sharing 98.6 % NI. The three South African strains clustered with strain *Bradyrhizobium* sp. VUPME10 that belongs to the symbiovar (sv.) *vignae*, sharing 95.5 % NI. Strain CNPSo 4027 clustered with strains belonging to sv. *genistearum*, being more related to *B. canariense*, sharing 99.2 % of

NI. The other nine strains were clustered with sv. *retamae* with a bootstrap support of 99 %, together with seven *Bradyrhizobium* species, *B. valentinum*, *B. algeriense*, *B. retamae*, *B. icense*, *B. namibiense*, *B. lablabi* and *B. paxllaeri*, and with NI ranging from 95.0 to 100 % among the strains, and from 94.2 to 98.4 % with the species of this symbiovar (Fig. 3, Table S4).

rep-PCR genomic fingerprinting

The genomic profiles were obtained from the amplification of BOX elements of the 21 strains from this study and of nine *Bradyrhizobium* species showing higher similarity in the MLSA phylogeny; the dendrogram indicated great genetic variability, with the majority of the strains occupying isolated positions (Fig. 4). Only two clusters included strains showing 100 % similarity, one with strains WSM 1736 and WSM 1737 isolated from nodules of *Indigofera* sp. in Western Australia, and the other with strains WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400, isolated from *Glycine* sp. in South Africa. The cluster analysis indicated intraspecific diversity within two groups pointed out as potential new species in the MLSA analysis, subgroup GII.IV with strains WSM 1744, WSM 1736 and WSM 1737, and subgroup GII.VI with strains WSM 1742 and WSM 1791. Intraspecific diversity was also observed in subgroups GI.I, GI.II, GI.V, and GII.VII (Fig. 4).

Discussion

Nitrogen is a limiting factor for plant growth, and the supply of this nutrient by the BNF process highly contributes to agricultural sustainability, in addition to lowering the costs for the farmers due to the replacement of expensive chemical N-fertilizers (Herridge et al., 2008; Hungria et al., 2015). However, the effectiveness of the BNF process relies on the selection of elite strains, preferentially from local populations, and for that it is necessary to access the rhizobial diversity, identifying and characterizing strains (Alves et al., 2003).

In our study, 18 out of the 21 strains were indigenous to Western Australia, isolated from nodules of at least ten different legumes and one was isolated from a soil sample. Australia is rich in rhizobial diversity, as reported previously, with the description of fast- and slow-growing strains (Lange et al., 1961; Lawrie, 1983; Marsudi et al., 1999; Yates et al., 2004). The three remaining strains were isolated from *Glycine* sp. in South Africa, a country also known as possessing high diversity of rhizobia (Naamala et al., 2016; Jaiswal and Dakora, 2019). The genetic profile and phylogenetic relationship of the 21 *Bradyrhizobium* strains from our study were accessed through analyses based on the 16S rRNA, housekeeping and symbiotic gene sequences, as well as on the amplification of genomic elements.

As reported in previous studies with *Bradyrhizobium*, the high conservation of the 16S rRNA genes in the genus does not provide sufficient evolutionary information (Menna et al., 2009a; Durán et al., 2014; Helene et al., 2015, 2017; Delamuta et al., 2017). Indeed, more than 90 % of the 16S rRNA sequences sites used in this study were conservative, not allowing clear species definition, only confirming the two main superclades of *B. japonicum* (GI), and of *B. elkanii* (GII), reported in other studies (Durán et al., 2014; Menna et al., 2009a; Helene et al., 2015, 2017; Delamuta et al., 2017). Several phylogenetic studies with *Bradyrhizobium* have shown that many species

share more than 99 % NI in the 16S rRNA (Willems et al., 2001; Wang et al., 2013; Delamuta et al., 2016; Helene et al., 2017). In addition, Durán et al. (2014) reported lower levels of 16S sequences conservation among species of the *B. japonicum* superclade (NI ranging from 98.4 to 99.8 %) than among species of the *B. elkanii* superclade (NI ranging from 99 to 99.9 %). Recently, a new similarity cutoff of 98.7 % for the 16S rRNA gene has been proposed for species delimitation, instead of the 97 % NI previously suggested (Chun et al., 2018).

Due to the limited resolution of the 16S rRNA genes, the analysis of other housekeeping genes shared within a bacterial genus is required to infer phylogeny in taxonomic relationships (Ribeiro et al., 2009; Tindall et al., 2010; Dai et al., 2012; Berrada and Fikri-Benbrahim, 2014; Chun and Rainey, 2014). In addition, approaches that operate large datasets with sufficient phylogenetic signals are more reliable, because they prevail the non-phylogenetic signals that influence smaller datasets (Chan et al., 2012; Lang et al., 2013). In rhizobia, housekeeping genes used include *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, *trpB* (Delamuta et al., 2012; Ribeiro et al., 2009, 2012; Dall’Agnol et al., 2017; Helene et al., 2015, 2017, 2019). For this study, four conserved housekeeping genes (*dnaK*, *glnII*, *gyrB* and *recA*) were selected to refine the phylogenetic analysis, as these genes are highly conserved among bacteria of the order Rhizobiales, and the four phylogenies based on the individual genes were congruent with the 16S rRNA, providing a better definition of the subgroups.

The highest distinction was achieved with *glnII* gene, confirming a previous study by Roma Neto et al. (2010), which emphasized that this gene is an appropriate molecular marker for rhizobia. It is important to mention that in our study intra- and interspecific diversity was verified in the analyses of each housekeeping gene. Interestingly, *B. denitrificans* and *B. oligotrophicum* species clustered together and

occupied isolated positions; both strains were reclassified from the genera *Blastobacter* and *Agromonas*, respectively, into *Bradyrhizobium* due to the 16S rRNA phylogeny, even though they differ in phenotypic and genotypic properties in relation to other *Bradyrhizobium* species (van Berkum et al., 2006; Ramírez-Bahena et al., 2013). Avontuur et al. (2019) studied *Bradyrhizobium* in a phylogenomic study and confirmed the taxonomic position of *B. oligotrophicum* in the genus and belonging to the photosynthetic group. Moreover, the authors also confirmed the monophyletic nature of *Bradyrhizobium* species, emphasizing that the recognition of the photosynthetic group as a separate genus would render the remained species as paraphyletic.

The MLSA provides a better resolution of the phylogenetic relationships among strains and also help to mitigate the misinterpretation caused due to recombination events that may occur in a single sequence (Zeigler, 2003; De Vos, 2012), representing an important tool for studies of prokaryotic diversity and taxonomy (Rong and Huang, 2012). A minimum of four genes has been suggested for studies with *Bradyrhizobium* (Menna et al., 2009a; Stepkowski et al., 2005; Delamuta et al., 2012). In our study, the MLSA phylogeny provided not only a better resolution to delineate the phylogenetic relationships, but also indicated putative new species. The general threshold for prokaryote species delineation using five concatenated sequences has been suggested as 96 % NI (Konstantinidis et al., 2006), but for the *Bradyrhizobium* the value suggested is of 97 % NI, also using five genes (Durán et al., 2014). Even so, four genes have proved to be highly discriminative for diversity and taxonomic studies with *Bradyrhizobium* (Delamuta et al., 2015; Helene et al., 2015, 2017). Therefore, considering the 97 % NI value as a threshold, seven subgroups should be emphasized. The results indicate two putative new species within the *B. japonicum* superclade, including GI.III (strain CNPSo 4016) and GI.IV (strain CNPSo 4010) and five putative new species within the

B. elkanii superclade, in GII.II (strain WSM 1704), GII.III (strain CNPSo 4026), GII.IV (strains WSM 1744, WSM 1737 and WSM 1736), GII.V (strain WSM 1738) and GII.VI (strains WSM 1742 and WSM 1791). Noticeable, it has been reported in a study with Australian isolates that most of the indigenous *Bradyrhizobium* belonged to the *B. japonicum* superclade (Lafay and Burdon, 2001), but our study pointed out that five out of the seven putative new groups belong to the *B. elkanii* superclade.

It is noteworthy that subgroup GII.I, which includes the three South African strains, shared more than 97 % NI in the concatenated sequences with three distinct species, *B. brasilense*, *B. pachyrhizi* and *B. elkanii*. Therefore, a study including more housekeeping genes, in addition to genomic analyses might clarify the taxonomic position of the South African strains.

The fingerprinting analysis is appropriated to investigate the genetic diversity among strains, being also useful for the identification of strains in culture collections, quality control of commercial inoculants, among others (Menna et al., 2009b). High diversity of genetic profiles within the *Bradyrhizobium* genus has been highlighted in several studies, including recent reports (Bourebaba et al., 2016; Chen et al., 2016; Delamuta et al., 2017). Accordingly, in our study, considering the cut-off of 70 % of similarity of rep-PCR suggested for rhizobial diversity (Kaschuk et al., 2006; Menna et al., 2009b), the BOX-PCR profiles indicated a remarkable level of inter- and intraspecies diversity among the strains from our study, as the great majority occupied isolated positions in the dendrogram. Only two groups clustered strains sharing 100 % of similarity, one with strains WSM 1736 and WSM 1737, belonging to subgroup GII.IV and isolated from nodules of *Indigofera* sp. in Minilya, Australia, and the other with strains WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400, belonging subgroup GII.I and isolated from nodules of *Glycine* sp. in the Amathole District, South Africa. Strains of

both groups did not show any distinction in any results from this study, indicating that they represent clones.

The symbiotic *nodC* gene encodes the N-acetylglucosaminyl transferase, an enzyme involved in the Nod factor (NF) synthesis playing a key role in the rhizobia-legume association, and was also analyzed in our study, since it is the gene most commonly used as phylogenetic marker related to symbiotic parameters, becoming a minimal standard for rhizobia symbiovar (sv.) definition (Perret et al., 2000; Vinuesa et al., 2005; Bejarano et al., 2014; Peix et al., 2015; Delamuta et al., 2017). Rogel and collaborators (Rogel et al., 2011) proposed the term “symbiovar” to define a group of strains that are able to accomplish symbiosis with a specific legume. What defines a symbiovar is the range of legumes that the strains can nodulate, and the definition has been based mainly on the *nodC* and other symbiotic genes. Nowadays, there are 11 symbiovars described for *Bradyrhizobium* and they are indicated in Fig 3. Delamuta et al. (2017) studied symbiotic genes in *Bradyrhizobium* genus and suggested the value of 92.5 % NI on *nodC* sequences to distinguish symbiovars. In our study, considering the suggested value of 92.5 % NI, 13 strains were positioned in described symbiovars, while seven others were clustered as putative new symbiovars. Strain CNPSo 4017 was isolated from *Glycine tabacina*, and occupied an isolated position, and the closest sv. was *glycinearum*, which comprises strains able to establish symbiosis with members of the Phaseolae tribe (Vinuesa et al., 2005; Bejarano et al., 2014). Strains of sv. *glycinearum* shared 100 % NI with each other and of 92.1 % with CNPSo 4017. Strain CNPSo 4011 might compose a new sv. with *B. liaoningense* CCBAU 33113 and *B. yuanmingense* LMG 21827^T. Strains CNPSo 4010 and WSM 1743 were related and did not cluster with any described sv., and the same for strain CNPSo 4016, isolated from *G. tabacina*.

The South African strains (WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400) showed higher similarity of NI of *nodC*, of 95.5 %, with strain *Bradyrhizobium* sp. VUPME10, member of sv. *vignae*, found in nodules of *Vigna unguiculata* (Bejarano et al., 2014). Strain CNPSo 4027, isolated from a soil sample, clustered with strains from sv. *genistearum* (Vinuesa et al., 2005), which is the common endosymbiont of Genisteeae legumes in Europe and Africa (Cobo-Diaz et al., 2014; Stepkowski et al., 2005, 2011). In addition, *B. cytisi* shared 91.8 % NI with CNPSo 4017, and the other strains from sv. *genistearum* shared more than 93.1 % NI with CNPSo 4017, pointing that these strains should belong to this symbiovar. Another distinct group was formed by *B. ganzhouense* and strain CNPSo 4019, isolated from *G. max*, sharing 95.0 % NI of *nodC*, and might also represent a new symbiovar; the same for strain CNPSo 4026, isolated from *Vigna unguiculata* and occupying a distinct position. Finally, the remaining nine strains (WSM 1742, WSM 1791, WSM 1744, WSM 1736, WSM 1737, WSM 1738, WSM 1735, WSM 1741 and WSM 1790) clustered as sv. *retamae*, described as symbionts of *Retama* plants (Guerrouj et al., 2013). However, all hosts of the strains in our study belong to the subfamily Faboideae (=Papilionoideae).

The divergence between symbiotic and housekeeping phylogenies observed with our strains is in agreement with other studies of *Bradyrhizobium* genus (Menna and Hungria, 2011; Delamuta et al., 2017), supporting the theory that the evolutionary history among symbiotic and core genes are not the same.

In conclusion, this study highlighted a remarkable level of diversity within the genus *Bradyrhizobium*, with an emphasis on the isolates from Western Australian soils, trapped by legumes of the genera *Glycine*, *Tephrosia*, *Rhynchosia*, *Indigofera* and *Muelleranthus*. In addition, putative new species and symbiovars have been found, indicating that research on diversity and characterization of nodule symbionts from

these soils should be intensified, highly contributing to the clarification of phylogenetic and taxonomic relationships among *Bradyrhizobium* strains.

Acknowledgements

Funded by INCT-Plant-Growth Promoting Microorganisms for Agricultural Sustainability and Environmental Responsibility (CNPq 465133/2014-2, Fundação Araucária-STI, CAPES), Embrapa (02.13.08.001.00.00), CNPq-Universal (400468/2016-6), L.C.F. Helene acknowledges a PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - Finance Code 001). Authors thank to Dr. Renan A. Ribeiro, Dr. Jaqueline R.M. Delamuta and Ligia Maria O. Chueire (Embrapa Soja) for help in several steps of this study

Funding

Funded by INCT-Plant-Growth Promoting Microorganisms for Agricultural Sustainability and Environmental Responsibility (CNPq 465133/2014-2, Fundação Araucária-STI, CAPES), Embrapa (02.13.08.001.00.00), CNPq-Universal (400468/2016-6).

Ethics approval and consent to participate

The authors declare no ethical conflicts; authors declare that they have consented to participate in the manuscript and publish it.

Competing interests

The authors declare no competing interests

References

- Alves, B.J., Boddey, R.M., Urquiaga, S. (2003) The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant Soil*. 252, 1-9.
- Avontuur, J.R., Palmer, M., Beukes, C.W., Chan, W.Y., Coetzee, M.P.A., Blom, J., Stępkowski, T., Kyrpides, N.C., Woyke, T., Shapiro, N., Whitman, W.B., Venter, S.N., Steenkamp, E.T. (2019) Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Syst. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.03.006>
- Bejarano, A., Ramírez-Bahena, M., Velázquez, E., Peix, A. (2014) *Vigna unguiculata* is nodulated in Spain by endosymbionts of Genisteeae legumes and by a new symbiovar (vignae) of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 533-540.
- Berrada, H., Fikri-Benbrahim, K. (2014) Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *Br. Microbiol. Res. J.* 4, 616-639.
- Botha, W.J., Bloem, J.F., Law, I.J. (2002). *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) in the winter rainfall region of South Africa. *Biol. Fertil. Soils*. 36, 335-343.
- Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., Palacios, F.M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L. (2016) Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 266-274.
- Chen, J., Hu, M., Ma, H., Wang, Y., Wang, E.T., Zhou, Z., Gu, J. (2016) Genetic diversity and distribution of bradyrhizobia nodulating peanut in acid-neutral soils in Guangdong Province. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 418-427.
- Chan, J.Z., Halachev, M.R., Loman, N.J., Constantinidou, C., Pallen, M.J. (2012) Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol.* 12, 1-11.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., De Meyer, S., Trujillo, M.E. (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 461-466.
- Chun, J., Rainey, F.A. (2014) Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 316-324.
- Cobo-Díaz, J.F., Martínez-Hidalgo, P., Fernández-González, A.J., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E., Fernández-López, M. (2014) The endemic *Genista versicolor* from Sierra Nevada National Park in Spain is nodulated by putative new *Bradyrhizobium* species and a novel symbiovar (sierranevadense). *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 177–185.
- Costa, E.M., Guimarães, A.A., Carvalho, T.S., Rodrigues, T.L., Ribeiro, P.R.A., Lebbe, L. Willems, A., Moreira, F.M.S. (2018) *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient

nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Arch. Microbiol.* 200, 743-752.

Dai, J., Liu, X., Fang, Y. (2012) Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from *Caragana microphylla* growing in desert soil in Ningxia, China. *Genet. Mol. Res.* 11, 2683-2693.

Dall'Agnol, R.F., Bournaud, C., Faria, S.M., Béna, G., Moulin, L., Hungria, M. (2017) 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 Microbiol. Ecol.* 93, 1-15.

De Vos, P. (2012) Multilocus sequence determination and analysis. In: Rainey, F.; Oren, A. (Eds.), *Taxonomy of Prokaryotes.*: Elsevier Science, San Diego, pp. 385-407.

Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Araújo, J.L.S., Rouws, L.F.M., Zilli, J.E.; Parma, M.M., Melo, I.S., Hungria, M. (2016) *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 3078-3087.

Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A.; Menna, P.; Bangel, E.V.; Hungria, M. (2012) Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 43, 698-710.

Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Menna, P., Hungria, M. (2017) Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 254-265.

Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Parma, M.M., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2015) *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4424-4433.

Durán, D., Rey, L., Mayo, J., Zúñiga-Dávila, D., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Martínez-Romero, E., Ormeño-Orrillo, E. (2014) *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.* 64, 2072-2078.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic. Acids. Res.* 32, 1792-1797.

Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39, 783-791.

Grönemeyer, J.L., Reinhold-Hurek, B. (2018) Diversity of bradyrhizobia in Sub-sahara Africa: a rich resource. *Front. Microbiol.* 9, 1-8.

Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.H., Abdel-moumen, H., Quiñones, M.A., El Idrissi, M.M., Velázquez, E., Fernández-Pascual, M., Bedmar, E.J., Peix, A. (2013) Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within

Bradyrhizobium retamae sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. Syst. Appl. Microbiol. 36, 218-223.

Guimarães, A.A., Florentino, L.A., Almeida, K.A., Lebbe, L., Silva, K.B.; Willems, A., Moreira, F.M.S. (2015) High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. Syst. Appl. Microbiol. 39, 433-441.

Helene, L.C.F., Dall'Agnol, R.F., Delamuta, J.R.M., Hungria, M. (2019) *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov., a new nitrogen-fixing species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (doi:10.1099/ijsem.0.003397).

Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Hungria, M. (2017) *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67, 1827-1834.

Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M.A., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2015) *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 4441-4448.

Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil. 311, 1-18.

Hungria, M., Menna, P., Delamuta, J.R.M. (2015) *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. In: de Bruijn, F. (Ed), Biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons, Hoboken, pp. 191–202.

Hungria, M., O'Hara, G.W., Zilli, J.E., Araujo, R.S., Deaker, R., Howieson, J.G. (2016) Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson, J.G.; Dilworth, M.J. (Eds.), Working with rhizobia, ACIAR, Canberra, Australia, pp. 39–60.

Jaccard, P. (1912) The distribution of flora in the alpine zone. New Phytol. 11, 37–50.

Jaiswal, S.K., Dakora, F.D. (2019) Widespread distribution of highly adapted *Bradyrhizobium* species nodulating diverse legumes in Africa. Front. Microbiol. 10, 1-16.

Jordan, D.C. (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 136-139.

Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D.S., Campo, R.J. (2006) Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. Appl. Soil Ecol. 32, 210-220.

Konstantinidis, K.T., Ramette, A., Tiedje, J.M. (2006) Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7286-7293.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33, 1870-1879.

- Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E., Udell, S.E. (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38, 501-505.
- Lafay, B., Burdon, J.J. (2001) Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 396-402.
- Lang, J.M., Darling, A.E., Eisen, J.A. (2013) Phylogeny of bacterial and archaeal genomes using conserved genes: supertrees and supermatrices. *PLoS ONE* 8, 1-15.
- Lange, R.T. (1961) Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of south-western Australia. *J. Gen. Microbiol.* 61, 851-859.
- Lawrie, A.C. (1983) Relationships among rhizobia from native Australian legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1822-1828.
- Lloret, L., Martínez-Romero, E. (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47, 43-60.
- Marsudi, N.D.S., Glenn, A.R., Dilworth, M.J. (1999) Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil. Biol. Biochem.* 31, 1229-1238.
- Menna, P., Hungria, M. (2011) Phylogeny of nodulation and nitrogen fixation genes in *Bradyrhizobium*: support for the theory of monophyletic origin and spread and maintenance by both horizontal and vertical transference. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 3052-3057.
- Menna, P., Barcellos, F.G., Hungria, M. (2009a) 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2934-2950.
- Menna, P., Pereira, A. A., Bangel, E. V., Hungria, M. (2009b) Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis.* 48, 120-130.
- Naamala, J., Jaiswal, S.K., Dakora, F.D. (2016) Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in South African soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 336-344.
- Parker, M.A. (2015) The spread of *Bradyrhizobium* lineages across host legume clades: from Abarema to Zygia. *Microb. Ecol.* 69, 630-640.
- Parte, A.C. (2018) LPSN-List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio. net) 20 years on. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1825-1829.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2015) Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 34, 17-42.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 180-201.

- Ramírez-Bahena, M.H., Chahboune, R., Peix, A., Velázquez, E. (2013) Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1013-1016.
- Reeve, W., Ardley, J., Tian, R., Eshragi, L., Yoon, J.W., Ngamwisetkun, P., Seshadri, R., Ivanova, N.N., Kyrpides, N.C. (2015) A genomic encyclopedia of the root nodule bacteria: Assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Stand. Genomic. Sci.* 10, 1-8.
- Ribeiro, R.A., Barcellos, F.G., Thompson, F.L., Hungria, M. (2009) Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* strains microsymbionts of common beans (*Phaseolus vulgaris*) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res. Microbiol.* 160, 297-306.
- Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., López-López, A., Ormeño-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martínez, J., Thompson, F.L., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2012) Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1180-1185.
- Rivas, R., Martens, M., de Lajudie, P., Willems, A. (2009) Multilocus sequence analysis of the *Bradyrhizobium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 101–110.
- Rodríguez-Echeverría, S., Le Roux, J.J., Crisóstomo, J.A. (2011) Jack-of-all-trades and master of many? How does associated rhizobial diversity influence the colonization success of Australian *Acacia* species? *Divers. Distrib.* 17, 946–957.
- Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., and Martínez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. App. Microbiol.* 34, 96–104
- Roma Neto, I.V., Ribeiro, R.A., Hungria, M. (2010) Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1291-1302.
- Rong, F.; Huang, Y. (2012) Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 7-18.
- Schwarz, G. (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* 6, 461-464.
- Sneath, P.B.A., Sokal, R.R. (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification, In: Kennedy, D., Park, R.B. (Eds.), A series of books in biology. W. H. Freeman and Company, San Francisco, pp. 573.
- Stepkowski, T., Moulin, L., Krzyzanska, A., McInnes, A., Law, I.J., Howieson, J. (2005) European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7041-7052.
- Stepkowski, T., Zak, M., Moulin, L., Króliczak, J., Golińska, B., Narozna, D., Safronova, V. I., Madrzak, C.J. (2011) *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 368-375.

- Strijdom, B.W. (1998) South African studies on biological nitrogen-fixing systems and the exploitation of the nodule bacterium-legume symbiosis. *South Afr. J. Sci.* 94, 11-23.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 249-266.
- van Berkum, P., Fuhrmann, J.J. (2000) Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2165-2172.
- van Berkum, P., Leibold, J.M., Eardly, B. (2006) Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 207-215.
- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: *Genisteae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 569-575.
- Vinuesa, P., Rojas-Jiménez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S.K., Prasad, B.N., Moe, H., Selvaraju, S.B., Thierfelder, H., Werner, D. (2008) Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6987-6996.
- Wang, R., Chang, Y.L., Zheng, W.T., Zhang, D., Zhang, X.X., Sui, X.H., Wang, E.T., Hu, J.Q., Zhang, L.Y., Chen, W.X. (2013) *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 101-105.
- Willems, A., Coopman, R., Gillis, M. (2001) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 111-117.
- Yates, R.J., Howieson, J.G., Nandasena, K.G., O'Hara, G.W. (2004) Root-nodule bacteria from indigenous legumes in the north-west of Western Australia and their interaction with exotic legumes. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1319-1329.
- Zeigler, D.R. (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1893-1900.

Figures Legends

Fig. 1. Maximum-likelihood phylogeny based on the 16S rRNA gene sequences, using the Tamura 3-parameter +G +I model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

Fig. 2. Maximum-likelihood phylogeny based on the concatenated sequence (*dnaK+glnII+gyrB+recA*), using the General Time Reversible +G +I model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

Fig. 3. Maximum-likelihood phylogeny based on the symbiotic gene *nodC*, using the Tamura 3-parameter +G +I model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

Fig. 4. Cluster analysis of products obtained by BOX-A1R-PCR of strains in study (shown in bold) and closely related *Bradyrhizobium* species. Analysis performed with software Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6) using the

UPGMA algorithm (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) and the Jaccard coefficient, with 1% tolerance.

Table1. Strains, hosts and sites of origin of the strains from this study.

Strains (synonymy) ^a	Host	Country	Region	Site ^b
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4398 (=CNPSo 4029)	<i>Glycine</i> sp.	South Africa	Amathole District	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4399 (=CNPSo 4030)	<i>Glycine</i> sp.	South Africa	Amathole District	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4400 (=CNPSo 4015)	<i>Glycine</i> sp.	South Africa	Amathole District	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4027	Soil Sample	Australia	Perth	2
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4026	<i>Vigna unguiculata</i>	Australia	Salmon Gums	3
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1704 (=CNPSo 4028)	<i>Tephrosia gardneri</i>	Australia	Carnarvon	4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1735 (=CNPSo 4023)	<i>Rhynchosia minima</i>	Australia	Cape Range National Park	5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1736 (=CNPSo 4012)	<i>Indigofera</i> sp.	Australia	Minilya	6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1737 (=CNPSo 4024)	<i>Indigofera</i> sp.	Australia	Minilya	6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1738 (=CNPSo 4025)	<i>Indigofera</i> sp.	Australia	Cape Range National Park	7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1741 (=CNPSo 4020)	<i>Rhynchosia minima</i>	Australia	Cape Range National Park	5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1742 (=CNPSo 4021)	<i>Indigofera</i> sp.	Australia	Carnarvon	9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1743 (=CNPSo 4022)	<i>Indigofera</i> sp.	Australia	Macleod	9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1744 (=CNPSo 4013)	<i>Muelleranthus trifoliolatus</i>	Australia	Wooramel	10
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1790 (=CNPSo 4018)	<i>Indigofera colueta</i>	Australia	North West Cape	11
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1791 (=CNPSo 4014)	<i>Indigofera</i> sp.	Australia	Carnarvon	9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4019	<i>Glycine max</i>	Australia	Nambung	12

<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4009	<i>Glycine max</i>	Australia	Nilgen	13
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4016	<i>Glycine tabacina</i>	Australia	Kununurra	14
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4010	<i>Glycine clandestina</i>	Australia	Kununurra	14
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4008	<i>Glycine clandestina</i>	Australia	Kununurra	14
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4011	<i>Glycine max</i>	Australia	Kununurra	14
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4017	<i>Glycine tabacina</i>	Australia	Kununurra	14

^a In bold strains isolated in a previous study (Yates et al., 2004).

^b As indicated in supplementary Fig. S1.

Table 2. Percentage of nucleotide identity (NI) among strains in study and related type strains.

	Nucleotide Identity (%)					
	16S	<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	MLSA
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4019						
Between strain and type strains						
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	100	98.6	94.8	98.0	98.6	97.2
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	99.3	96.8	96.0	95.2	95.4	95.7
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	99.7	94.5	94.0	96.3	94.6	95.0
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	99.3	95.9	94.4	94.5	95.2	94.8
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	99.8	96.8	93.6	96.3	92.5	94.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4016						
Between strain and type strains						
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4010	100	98.1	97.4	96.9	95.7	96.9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4017	99.8	98.6	96.2	94.0	95.2	95.9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4011	100	97.7	95.8	93.4	95.4	95.2
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	99.6	98.1	95.8	93.4	95.2	95.2
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4019	99.6	96.8	94.8	93.2	93.8	94.3
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	100	89.5	97.4	93.2	94.6	94.3
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4010						
Between strain and type strains						
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4016	100	98.1	97.4	96.9	95.7	96.9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4017	99.8	99.5	95.8	94.9	94.6	95.7
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	99.6	99.0	95.8	94.7	94.6	95.6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4011	100	98.6	95.8	94.3	93.8	95.2
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	99.6	97.2	94.8	93.2	93.8	94.4
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	100	90.4	96.4	93.8	94.9	94.4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4011 and CNPSO 4017						
Among strains	99.8	99.0	98.4	98.1	98.6	98.4
Between strains and type strains						
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	99.5 - 99.6	98.6 - 99.5	98.4 - 100	97.6 - 98.7	96.2 - 96.5	98.1 - 98.2
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4010	99.8 - 100	98.6 - 99.5	95.8	94.3 - 94.9	93.8 - 94.6	95.2 - 95.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 4016	99.8 - 100	97.7 - 98.6	95.8 - 96.2	93.4 - 94.0	95.2 - 95.4	95.2 - 95.5
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	99.5 - 99.6	96.8 - 97.7	95.4 - 95.6	93.8 - 94.5	93.0 - 93.6	94.5 - 95.0
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	98.8 - 99.0	96.3 - 97.2	93.8 - 94.2	94.0 - 94.7	94.6 - 95.2	94.5 - 94.9
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	99.5 - 99.6	95.4 - 96.3	94.6 - 94.8	94.0 - 94.5	94.4 - 94.6	94.5 - 94.8
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400						
Among strains	100	100	100	100	100	100
Between strains and type strains						
<i>B. brasilense</i> UFLA03-321 ^T	98.8	100	99.8	99.0	96.0	98.7
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	99.8	99.5	99.0	98.3	95.4	98.0
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	99.7	99.5	96.4	98.3	96.0	97.3
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	98.4	99.0	98.2	92.7	98.9	96.6
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T	99.8	97.7	95.6	95.2	96.5	96.0

<i>B. ripae</i> WR4 ^T	99.8	97.2	96.4	95.1	96.2	96.0
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T	99.6	96.8	96.4	95.8	95.2	96.0
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4027						
Between strain and type strains						
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	100	98.1	97.0	98.5	98.4	98.0
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	99.5	95.9	94.4	94.5	95.2	94.8
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	99.3	91.4	94.8	94.7	96.5	94.7
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	99.6	95.9	94.6	94.9	93.6	94.6
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	99.6	95.4	94.2	94.3	94.9	94.6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4019 ^T	99.5	95.9	94.0	94.7	94.4	94.6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4026						
Between strain and type strains						
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	98.7	87.7	88.1	90.7	92.0	89.8
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	98.7	89.1	91.0	87.3	91.7	89.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4019	95.6	85.9	89.3	88.4	93.0	89.4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1735	98.5	89.5	90.2	87.5	90.9	89.4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1741	98.5	89.5	90.2	87.5	90.9	89.4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1704						
Between strain and type strains						
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	99.6	94.5	94.8	94.0	95.2	94.6
<i>B. brasilense</i> UFLA03-321 ^T	99.0	94.5	95.6	94.0	93.3	94.4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4398	99.8	94.5	95.4	94.0	92.2	94.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4399	99.8	94.5	95.4	94.0	92.2	94.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4400	99.8	94.5	95.4	94.0	92.2	94.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1735, WSM 1741 and WSM 1790						
Among strains	99.6 - 100	99.5 - 100	98.4 - 100	93.8 - 100	97.6 - 100	97.7 - 100
Between strains and type strains						
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	99.5 - 99.8	97.7 - 98.1	97.6 - 98.0	96.1 - 96.9	96.8 - 97.0	97.0 - 97.3
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	99.4 - 99.7	94.1 - 94.5	96.4 - 96.8	93.4 - 94.9	94.9 - 95.7	95.0 - 95.4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1742	99.4 - 99.7	95.4 - 95.9	96.2 - 96.6	92.5 - 93.1	94.1 - 94.4	94.5 - 94.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1791	99.4 - 99.7	95.4 - 95.9	96.2 - 96.6	92.5 - 93.1	94.1 - 94.4	94.5 - 94.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1736, WSM 1737 and WSM 1744						
Among strains	100	99.5 - 100	99.8 - 100	99.2 - 100	98.6 - 100	99.3 - 100
Between strains and type strains						
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	99.4	96.3 - 96.8	93.0 - 93.2	93.4	94.4 - 94.9	94.0 - 94.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1738	99.3	95.9 - 96.3	93.8 - 94.0	93.4 - 93.8	90.6 - 91.2	93.4 - 93.5
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	99.4	95.4 - 95.9	90.8 - 91.0	93.2 - 93.6	93.8	92.9 - 93.2
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	99.1	93.2 - 93.6	90.8 - 91.0	94.2 - 94.5	93.3	92.8 - 93.1
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	99.4	95.0 - 95.4	90.0 - 90.2	94.0	92.0 - 92.2	92.5 - 92.6
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	99.4	95.0 - 95.4	89.7 - 89.9	92.9 - 93.2	93.6 - 93.8	92.4 - 92.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1738						
Between strain and type strains						
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1736	99.3	96.3	94.0	93.8	90.6	93.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1737	99.3	96.3	94.0	93.8	90.6	93.5

<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1744	99.3	95.9	93.8	93.4	91.2	93.4
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T	99.8	96.8	93.8	92.2	92.2	93.3
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	99.5	94.5	91.4	92.3	91.2	92.1
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1742 and WSM 1791						
Among strains	100	100	100	100	100	100
Between strains and type strains						
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	99.7	92.3	97.8	93.4	94.4	94.8
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1735	99.7	95.4	96.6	93.1	94.1	94.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1741	99.7	95.4	96.6	93.1	94.1	94.7
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	99.5	93.6	94.0	93.4	94.6	94.6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1790	99.4	95.9	96.2	92.5	94.4	94.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1743						
Between strain and type strains						
<i>B. subterraneum</i> 58-2-1 ^T	100	99.0	99.4	99.6	98.1	99.1
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	99.8	95.4	96.4	95.8	93.6	95.4
<i>B. forestalis</i> INPA54B ^T	99.6	89.1	97.6	94.5	95.7	95.0
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4017	99.7	88.2	96.8	94.2	94.6	94.3
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	99.5	87.7	96.2	94.0	95.4	94.1

Fig. 1

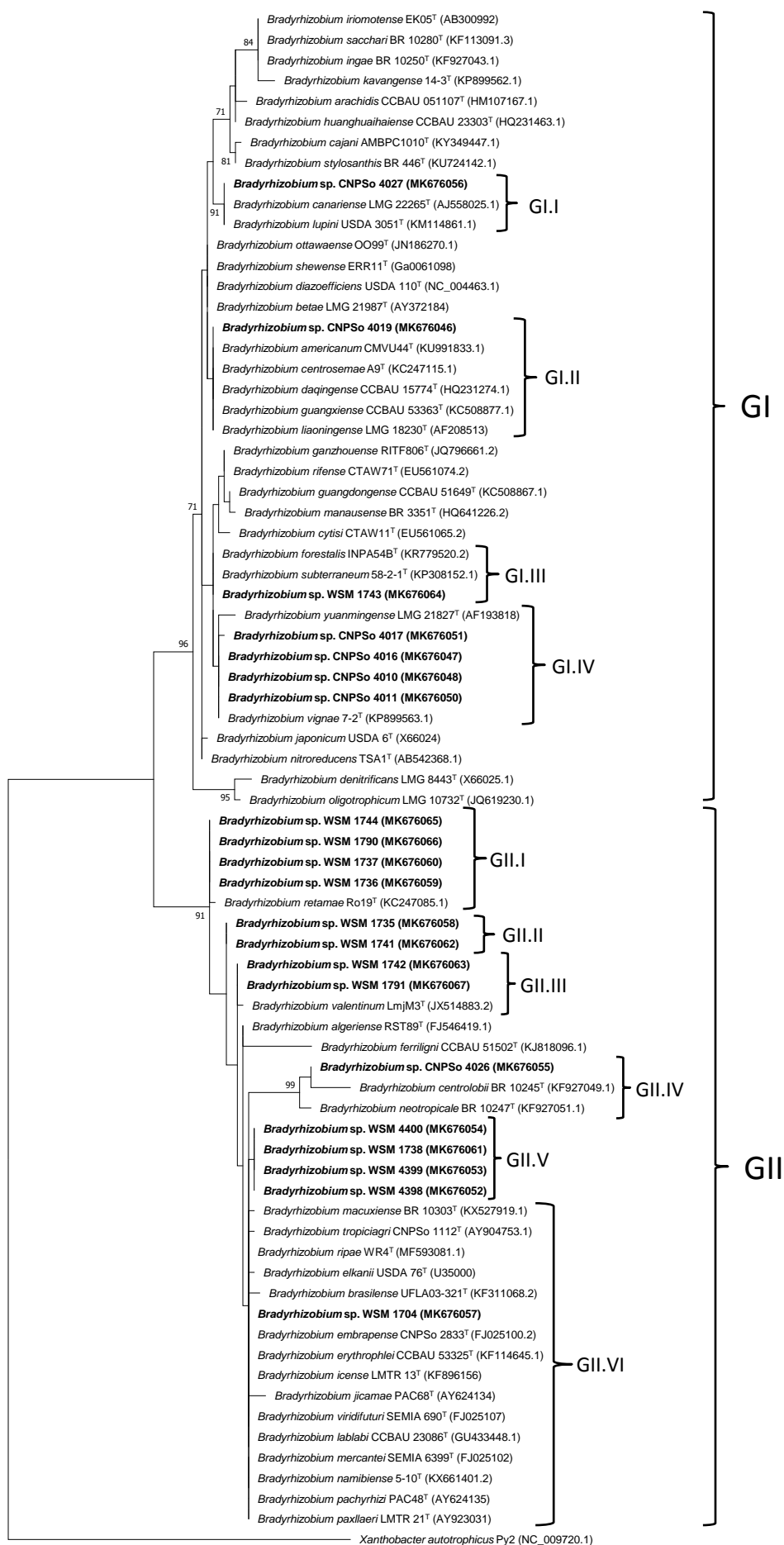


Fig. 2

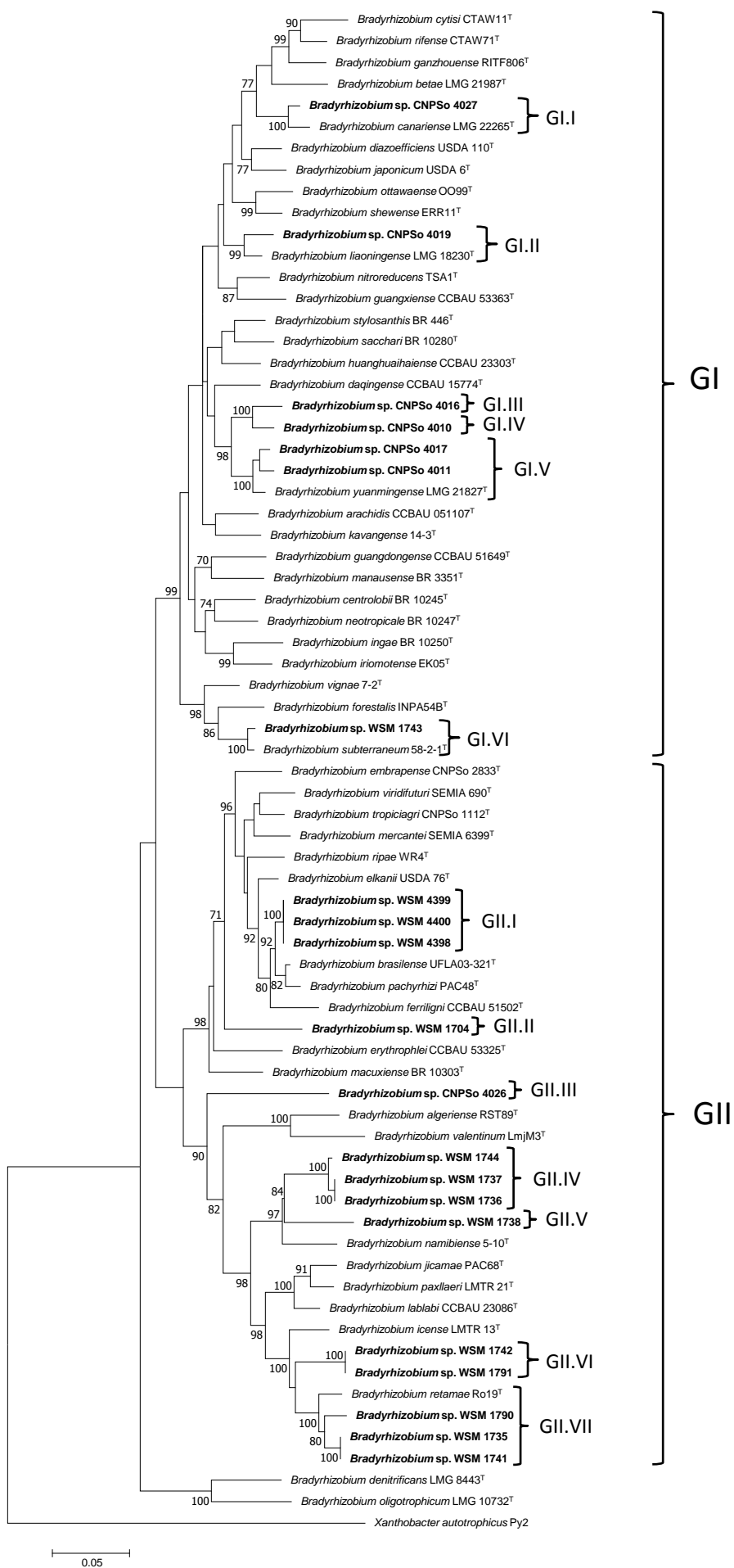
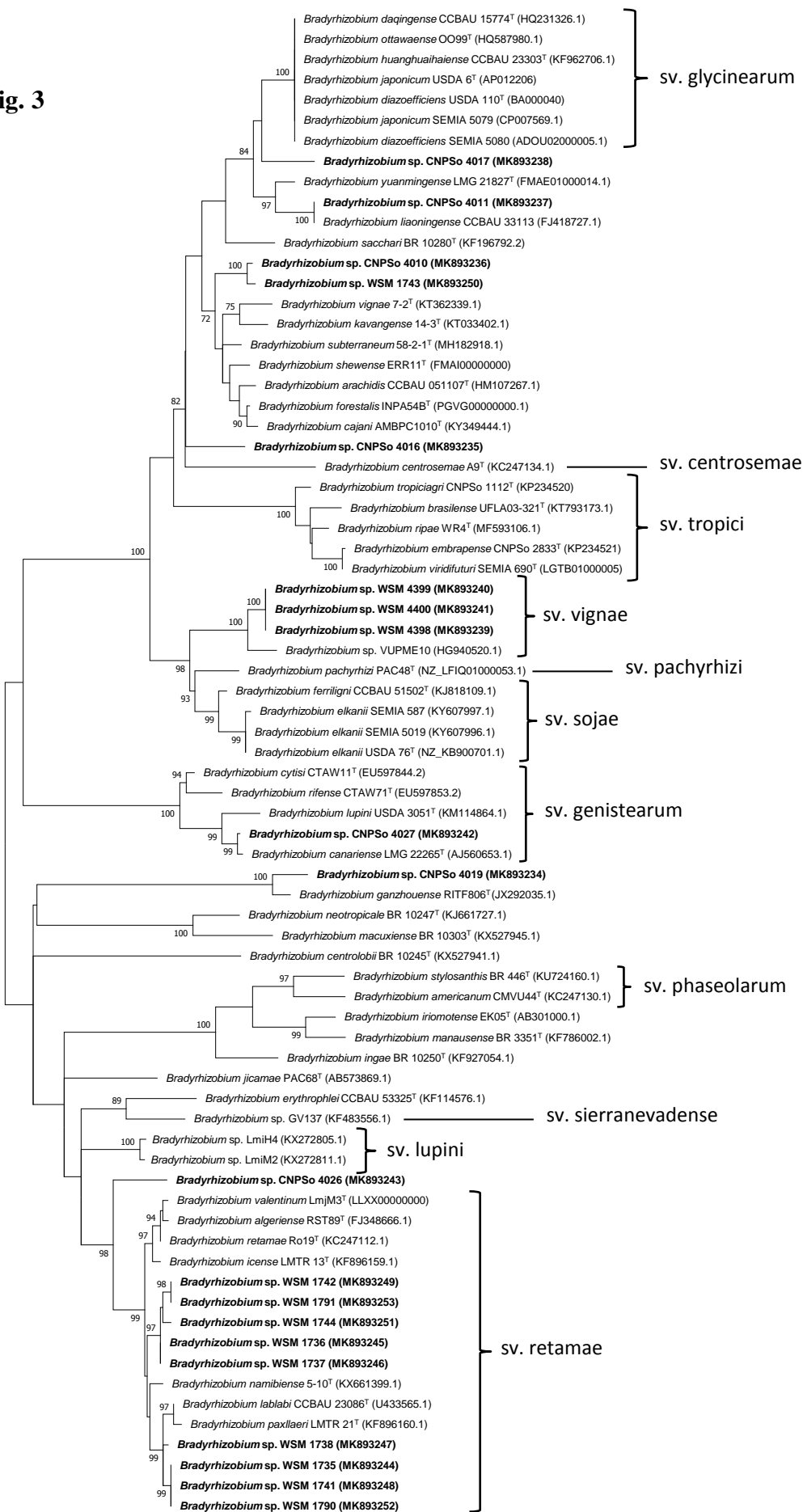


Fig. 3

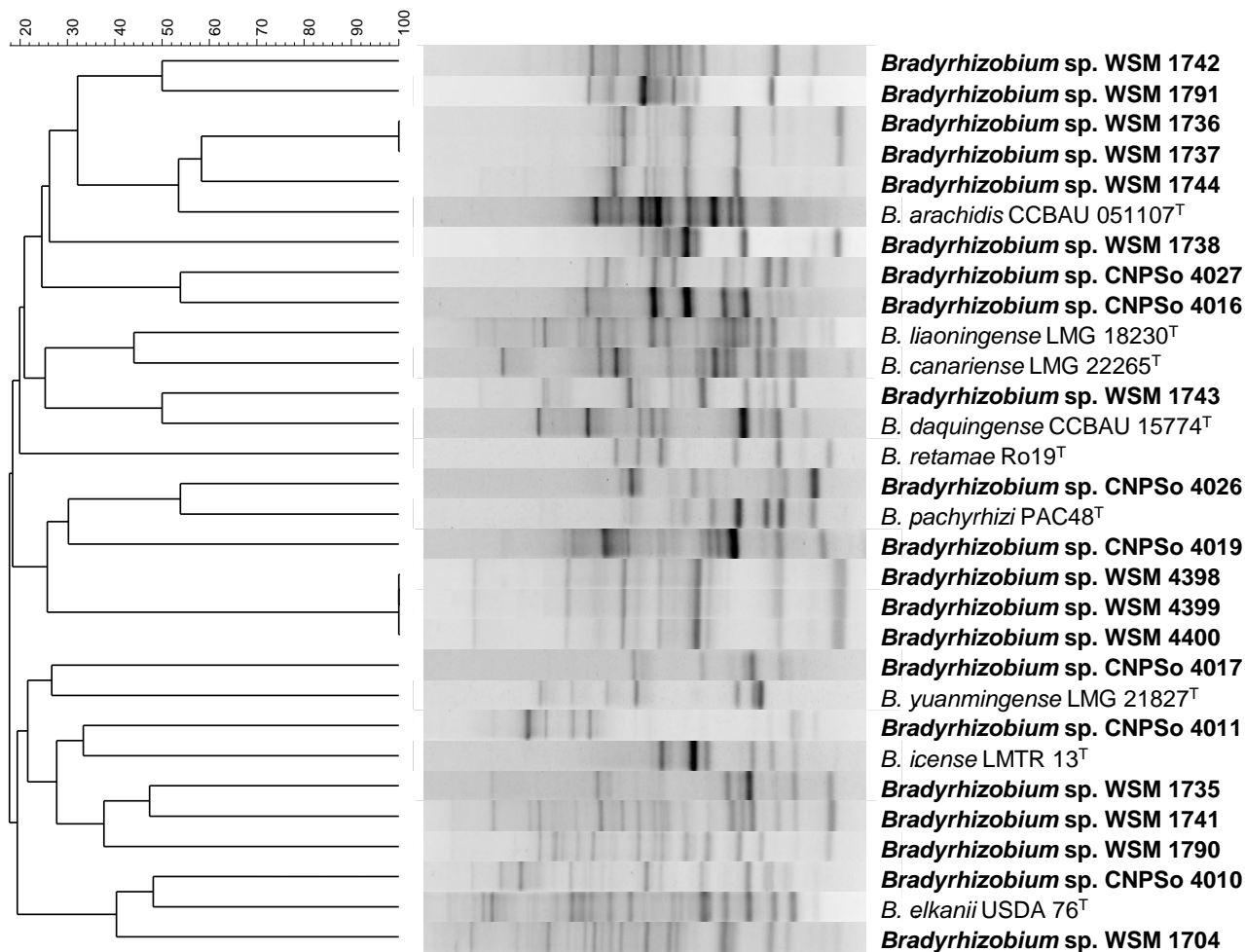


0.05

Fig. 4

BOX-PCR

BOX-PCR



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species

Luisa Caroline Ferraz Helene, Graham O'Hara, Mariangela Hungria

Table S1. Primers and cycles used for amplification of the rhizobial strains from this study.

Gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Cycles (references)
16S	PA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30 x (15 s 96 °C, 1 s 35 °C, 4 min 60 °C) (Vancanneyt et al., 2004)
	PH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
<i>dnaK</i>	BRdnaKf	TTCGACATCGACGCSAACGG	2 min 95 °C, 35 x (45 s 95 °C, 30 s 58 °C, 90 s 72 °C), 7 min 72 °C (Menna et. al., 2009)
	BRdnaKr	GCCTGCTGCKTGTACATGGC	
<i>glnII</i>	TSglnIIIf	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	2 min 95 °C, 35 x (45 s 95 °C, 30 s 58 °C, 1.5 min 72°C, 7 min 72 °C) (Stepkowski et al., 2005)
	TSglnIIr	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTTCG	
<i>gyrB</i>	gyrB343f	TTCGACCAGAAAYTCTTAYAAAGG	5min 95°C, 5X (2min 94°C, 2min 58°C, 1min 72°C) 28X (30s 94°C, 1min 58°C, 1min 72°C, 5 min 72°C) (Martens et al., 2007)
	gyrB1043r	AGCTTGTCCCTTSGTCTGCG	
<i>recA</i>	TSrecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG	2 min 95 °C, 35 x (45 s 95 °C, 30 s 58 °C, 90 s 72 °C), 7 min 72°C (Stepkowski et al., 2005)
	TSrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG	
<i>nodC</i>	NodC540F	TGATYGAYATGGARTAYTGGCT	5 min 95 °C 3 x (1 min 95 °C, 2 min 15 s 50 °C, 1 min 15 s 72 °C) 30 x (35 s 94 °C, 1 min 15 s 50 °C, 1 min 15 s 72 °C) 7 min 72 °C (De Meyer et al., 2011)
	NodC1164R	GAYARCCARTCGCTRRTTG	

References

- De Meyer, S.E., Van Hoorde, K., Vekeman, B., Braeckman, T., Willems, A. (2011) Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biol. Biochem.* 43, 2384-2396.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A. (2007) Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 57, 489-503.
- Menna, P., Pereira, A. A., Bangel, E. V., Hungria, M. (2009) Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis.* 48, 120-130.
- Stepkowski, T., Moulin, L., Krzyzanska, A., Mcinnes, A., Law, I.J., Howieson, J. (2005) European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7041-7052.
- Vancanneyt, M., Mengaud, J., Cleenwerck, I., Vanhonacker, K., Hoste, B., Dawyndt, P., Degivry, M. C., Ringuet, D., Janssens, D., Swings J. (2004) Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa et al. 1994 as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. kefirgranum subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa et al. 1988. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 551-556, 2004.

Table S2. NCBI and JGI accession numbers from genomes and housekeeping genes used in this study. The sequences ID obtained in this study are shown in bold.

Strain	Genome	16S	<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4398		MK676052	MK674807	MK860834	MK860855	MK863435
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4399		MK676053	MK674808	MK860835	MK860856	MK863436
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4400		MK676054	MK674809	MK860836	MK860857	MK863437
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4027		MK676056	MK674810	MK860837	MK860858	MK863438
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4026		MK676055	MK674811	MK860838	MK860859	MK863439
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1704		MK676057	MK674812	MK860839	MK860860	MK863440
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1735		MK676058	MK674813	MK860840	MK860861	MK863441
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1736		MK676059	MK674814	MK860841	MK860862	MK863442
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1737		MK676060	MK674815	MK860842	MK860863	MK863443
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1738		MK676061	MK674816	MK860843	MK860864	MK863444
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1741		MK676062	MK674817	MK860844	MK860865	MK863445
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1742		MK676063	MK674818	MK860845	MK860866	MK863446
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1743		MK676064	MK674819	MK860846	MK860867	MK863447
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1744		MK676065	MK674820	MK860847	MK860868	MK863448
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1790		MK676066	MK674821	MK860848	MK860869	MK863449
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1791		MK676067	MK674822	MK860849	MK860870	MK863450
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4019		MK676046	MK674802	MK860829	MK860850	MK863430
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4016		MK676047	MK674803	MK860830	MK860851	MK863431
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4010		MK676048	MK674804	MK860831	MK860852	MK863432
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4011		MK676050	MK674805	MK860832	MK860853	MK863433
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4017		MK676051	MK674806	MK860833	MK860854	MK863434
<i>B. algeriense</i> RST89 ^T	PYCM00000000	FJ546419.1	FJ546419.1	FJ264924.1		FJ264927.1
<i>B. americanum</i> CMVU44 ^T		KU991833.1	NA	KX012942.1	NA	KC247141.1
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T		HM107167.1	KJ560556	HM107251	JX437675	HM107233
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T		AY372184	FM253303	AB353733	AB353735	AB353734

<i>B. brasilense</i> UFLA03-321 ^T	MPVQ00000000	KF311068.2	KF452791.1		KF452827.1	KT793142.1
<i>B. cajani</i> AMBPC1010 ^T		KY349447.1	NA	KY349442.1	NA	KY349440.1
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T		AJ558025.1	AY923047	AY386765	FM253220	FM253177
<i>B. centrolobii</i> BR 10245 ^T		KF927049.1	KX527928.1	KX527991.1	KX528004.1	KX527954.1
<i>B. centrosemae</i> A9 ^T		KC247115.1	NA	KX012940.1	NA	KC247145.1
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T		EU561065.2	KF532219	GU001594	KF532653	KF532947
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T		HQ231274.1	KF962684	HQ231301	JX437669	HQ231270
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T		X66025.1	KF962685	HM047121	FM253239	EU665419
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463.1					
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	ARAG00000000	U35000		AY599117	AM418800	AY591568
<i>B. embiapense</i> CNPSo 2833 ^T		FJ025100.2	KP234519.2	GQ160500	HQ634891	HQ634899
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T		KF114645.1	KX690620	KF114693.1	KF114717.1	KF114669.1
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T		KJ818096.1	KX690619	KJ818099.1	KJ818102.1	KJ818112.1
<i>B. forestalis</i> INPA54B ^T	PGVG00000000	KR779520.2	KF452796.1		KF452831.1	KF452867.1
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T		JQ796661.2	KP420023	JX277110	KP420022	JX277144
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T		KC508867.1	KC508964.1	KC509023.1	KC509072.1	KC509269.1
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T		KC508877.1	KC508974.1	KC509033.1	KC509082.1	KC509279.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T		HQ231463.1	KF962686	HQ231639	JX437672	HQ231595
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T		KF896156	KF896182	KF896175	KF896201	JX943615
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T		KF927043.1	KF927055	KF927067	KF927079	KF927061
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T		AB300992	JF308944	AB300995	AB300997	AB300996
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T		X66024	AM182120	HQ587875	AB070586	AM182158
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T		AY624134	JF308945	FJ428204	HQ873309	HM047133
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T		KP899562.1	KR259949.1	KM378446.1	KX661397.1	KM378399.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T		GU433448.1	KF962687	GU433498	JX437670	GU433522
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T		AF208513	AY923041	AY386775	FM253223	FM253180
<i>B. lupini</i> USDA 3051 ^T		KM114861.1		KM114862.1	KM114862.1	KM114866.1
<i>B. macuxiense</i> BR 10303 ^T		KX527919.1	KX527932.1	KX527995.1	KX528008.1	KX527958.1
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T		HQ641226.2	KF786001	KF785986	KF786000	KF785992

<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 ^T		FJ025102	KX690617	KX690621	KX690623	KX690615
<i>B. namibiense</i> 5-10 ^T		KX661401.2	KP402058.1	KM378440.1	KX661393.1	KM378377.1
<i>B. neotropicale</i> BR 10247 ^T		KF927051.1	KJ661693	KJ661700	KJ661707	KJ661714
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 ^T	LFJC00000000	AB542368.1				
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T		JQ619230.1	KF962688	JQ619233	KF962697	JQ619231
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T		JN186270.1	JF308816	HQ587750	HQ873179	HQ587287
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T		AY624135	JF308946	FJ428201	HQ873310	HM047130
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T		AY923031	AY923038	KF896169	KF896195	JX943617
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T		KC247085.1	KF896184	KC247108	KF896204	KF962711
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T		EU561074.2	JQ945187	KF962692	KF532654	KF532948
<i>B. ripae</i> WR4 ^T		MF593081.1	MF593102.1	MF593086.1	MF593094.1	MF593090.1
<i>B. sacchari</i> BR 10280 ^T	LWIG00000000	KF113091.3	KX065103.1	KX065099.1		KX065095.1
<i>B. shewense</i> ERR11 ^T	FMAI00000000	Ga0061098*		JQ809893.1		JQ809837.1
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T		KU724142.1	KU724145.1	KU724148.1	KU724151.1	KU724163.1
<i>B. subterraneum</i> 58-2-1 ^T		KP308152.1	KP308157.1	KM378484.1	KX661396.1	KM378397
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 ^T		AY904753.1	FJ391008.1	FJ391048	HQ634890	FJ391168
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	LLXX00000000	JX514883.2		JX518575		JX518589.2
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T		KP899563.1	KR259951.1	KM378443.1	KX683216.1	KM378374.1
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T		FJ025107	KR149128	KR149131	KR149134	KR149140
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T		AF193818	FM253312	AY386780	FM253226	FM253183
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	NC_009720					

* Sequence retrieved from JGI genome portal

Table S3. Information about the sequences obtained in this study.

Locus	Strain analysed (n) ^a	Nucleotides (%)			Total ^b	Frequency T/C/A/G (%)
		Conserved	Variable	Parsimony-informative		
16S	74	831 (90.8)	75 (8.2)	43 (4.7)	896/915	20.5/24.1/24.5/30.9
<i>dnaK</i>	70	136 (61.5)	85 (38.5)	68 (30.8)	220/221	9.0/30.8/24.9/35.3
<i>glnII</i>	74	308 (60.9)	197 (39.0)	160 (31.7)	505/505	17.1/33.0/19.3/30.6
<i>gyrB</i>	70	315 (56.0)	237 (42.2)	185 (32.9)	550/562	16.0/32.1/21.0/30.9
<i>recA</i>	74	235 (62.7)	140 (37.3)	119 (31.7)	375/375	15.8/30.7/16.4/37.1
MLSA	70	996 (59.9)	657 (39.5)	530 (31.9)	1650/1663	15.3/31.8/20.0/32.8
<i>nodC</i>	74	156 (40.9)	225 (59.0)	210 (55.1)	381/381	22.8/30.1/19.2/27.8

^a (n) Number of strains analyzed; outgroup not included.

^b Number of positions in the final dataset/number of nucleotide positions aligned, including gaps.

Table S4. Nucleotide identity of *nodC* sequences of strains from this study.

<i>nodC</i> Nucleotide Identity (%)	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4017	
Between strain and reference strains	
sv. <i>glycinearum</i>	92.1
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	90.8
<i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1 ^T	90.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4011	88.9
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> CCBAU 33113	88.9
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4011	
Between strain and reference strains	
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> CCBAU 33113	100
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	94.4
sv. <i>glycinearum</i>	91.0
<i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1 ^T	89.7
<i>Bradyrhizobium sacchari</i> BR 10280 ^T	89.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4010 and WSM 1743	
Among strains	98.6
Between strains and reference strains	
<i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1 ^T	94.2 - 94.4
<i>Bradyrhizobium forestalis</i> INPA54B ^T	93.4 - 93.7
<i>Bradyrhizobium shewense</i> ERR11 ^T	93.4 - 93.7
<i>Bradyrhizobium cajani</i> AMBPC1010 ^T	92.9 - 93.1
<i>Bradyrhizobium arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	92.9 - 93.1
<i>Bradyrhizobium vignae</i> 7-2	92.1 - 92.3
<i>Bradyrhizobium kavangense</i> 14-3	91.6 - 91.8
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4016	
Between strain and reference strains	
<i>Bradyrhizobium subterraneum</i> 58 2-1 ^T	92.6
<i>Bradyrhizobium forestalis</i> INPA54B ^T	90.0
<i>Bradyrhizobium cajani</i> AMBPC1010 ^T	89.7
<i>Bradyrhizobium shewense</i> ERR11 ^T	89.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 4398, WSM 4399 and WSM 4400	
Among strains	100
Between strains and reference strains	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. VUPME10	95.5
<i>Bradyrhizobium ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	90.2
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> PAC48 ^T	89.5
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76 ^T	88.4
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 5019	88.4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4027	
Between strain and reference strains	
<i>Bradyrhizobium canariense</i> LMG 22265 ^T	99.2

<i>Bradyrhizobium lupini</i> USDA 3051 ^T	94.7
<i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11 ^T	93.1
<i>Bradyrhizobium rifense</i> CTAW71 ^T	91.8
<hr/> <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4019 <hr/>	
Between strain and reference strains	
<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i> RITF806 ^T	95.0
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4026	76.6
<i>Bradyrhizobium algeriense</i> RST89 ^T	75.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. LmiH4	75.5
<hr/> <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 4026 <hr/>	
Between strain and reference strains	
<i>Bradyrhizobium retamae</i> Ro19 ^T	90.8
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1736	90.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1737	90.5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM 1738	90.5
<i>Bradyrhizobium lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	90.5
<i>Bradyrhizobium icense</i> LMTR 13 ^T	90.5
<i>Bradyrhizobium valentinum</i> LmjM3 ^T	90.5
<i>Bradyrhizobium algeriense</i> RST89 ^T	90.5
<hr/> <i>Bradyrhizobium</i> sp. strains WSM 1742, 1791, 1744, 1736, 1737, 1738, 1735, 1741, 1790 (sv. <i>retamae</i>) <hr/>	
Among strains WSM strains	95.2 - 100
Between WSM strains and reference strains	
<i>Bradyrhizobium lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	95.0 - 98.4
<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	94.2 - 97.6
<i>Bradyrhizobium namibiense</i> 5-10 ^T	96.0 - 97.1
<i>Bradyrhizobium retamae</i> Ro19 ^T	95.8 - 96.8
<i>Bradyrhizobium icense</i> LMTR 13 ^T	95.8 - 96.8
<i>Bradyrhizobium algeriense</i> RST89 ^T	95.0 - 96.0
<i>Bradyrhizobium valentinum</i> LmjM3 ^T	95.0 - 96.0

SUPPLEMENTARY FIGURES

Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species

Luisa Caroline Ferraz Helene, Graham O'Hara, Mariangela Hungria.

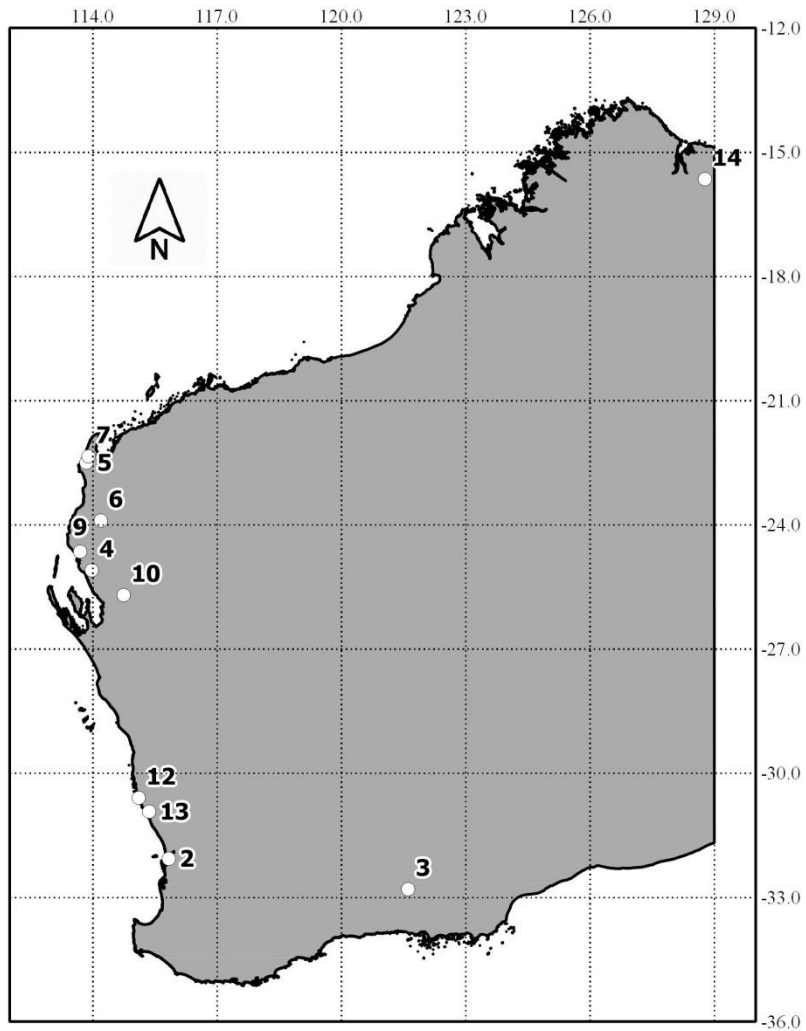


Fig. S1. Geographical locations of the sites in Western Australia from which soil samples and root nodule bacteria were collected.

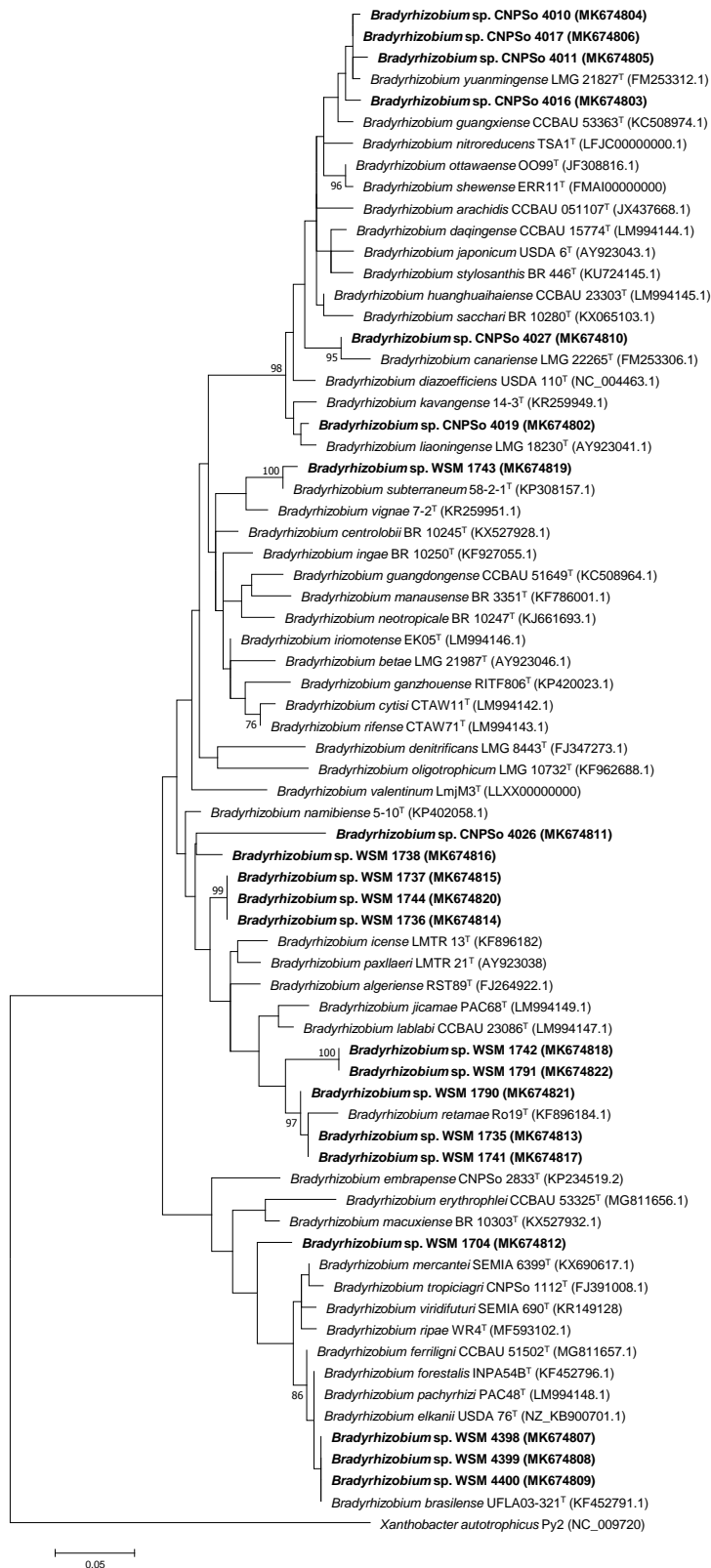


Fig. S2. Maximum-likelihood phylogeny based on the symbiotic gene *dnaK*, using the Tamura 3-parameter +G model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

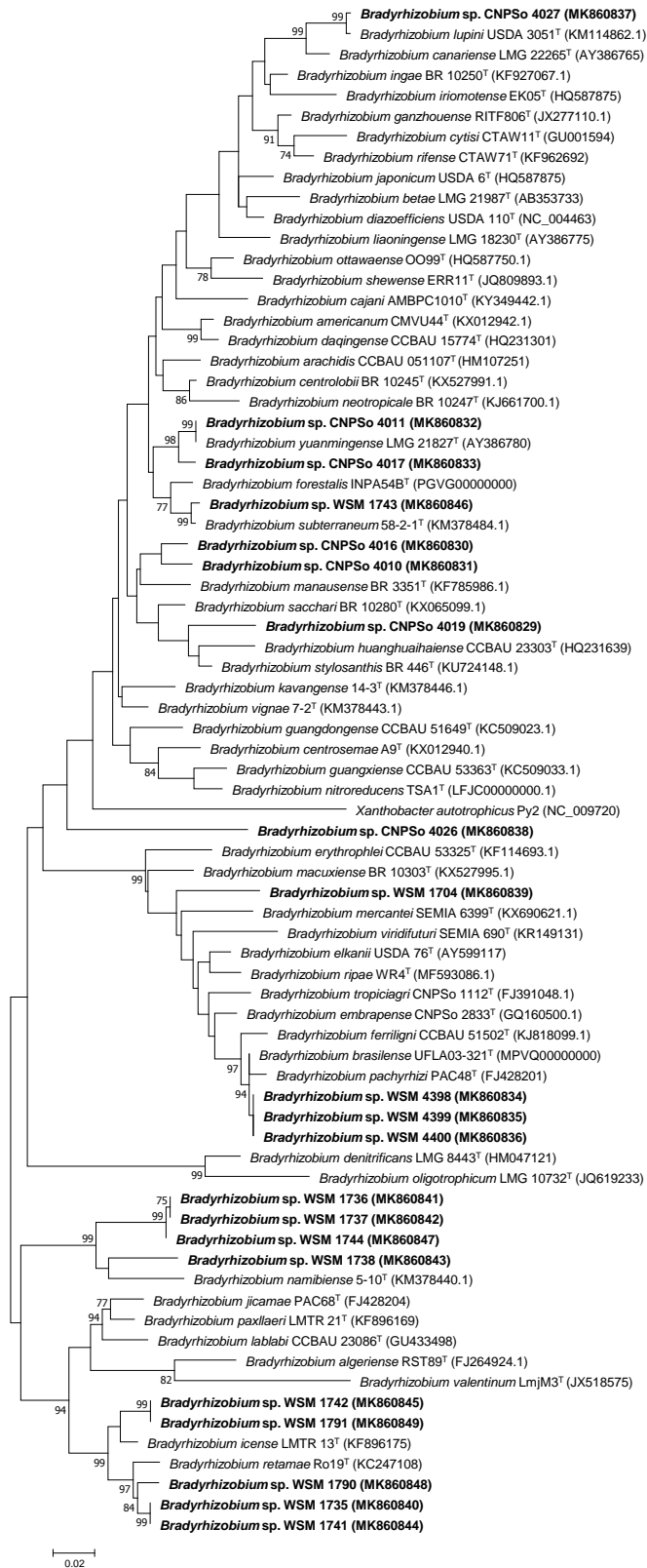


Fig. S3. Maximum-likelihood phylogeny based on the symbiotic gene *glnII*, using the General Time Reversible +G +I model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

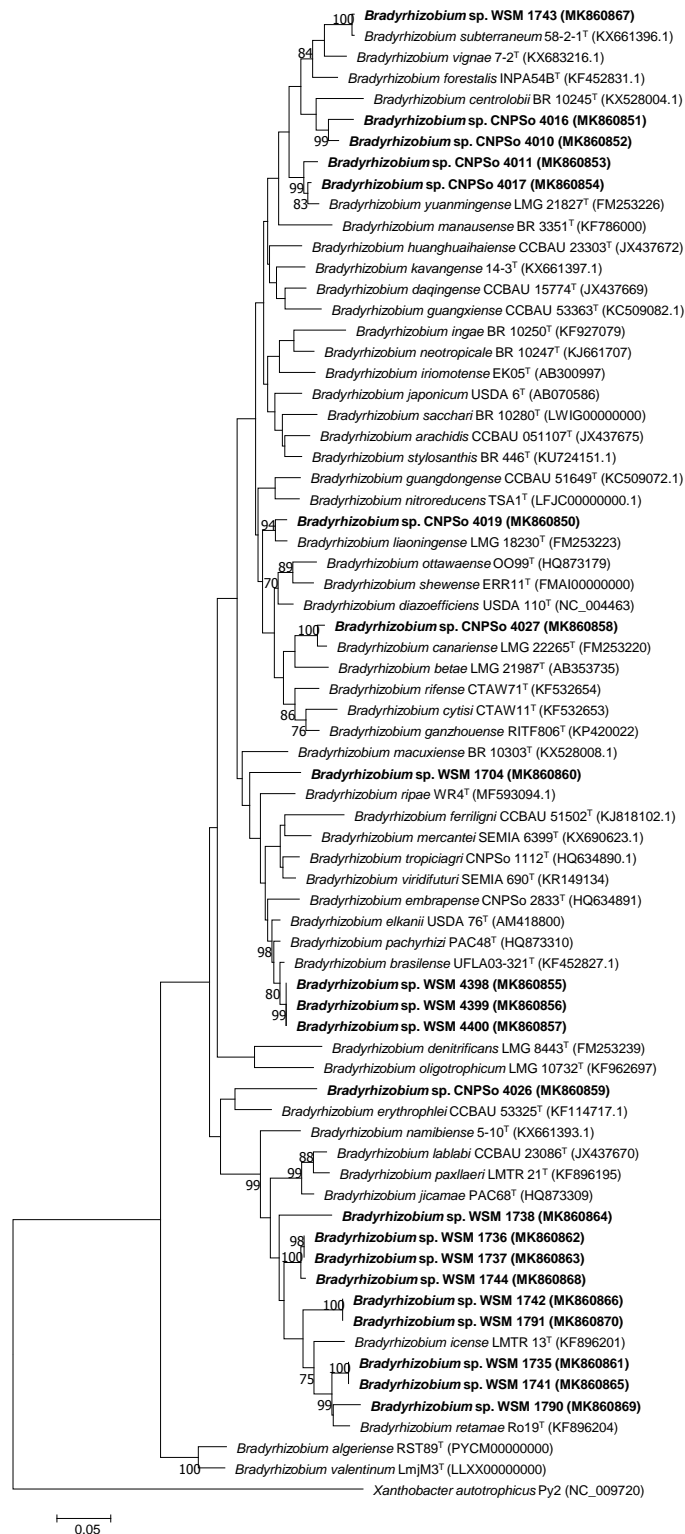


Fig. S4. Maximum-likelihood phylogeny based on the symbiotic gene *gyrB*, using the General Time Reversible +G +I model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

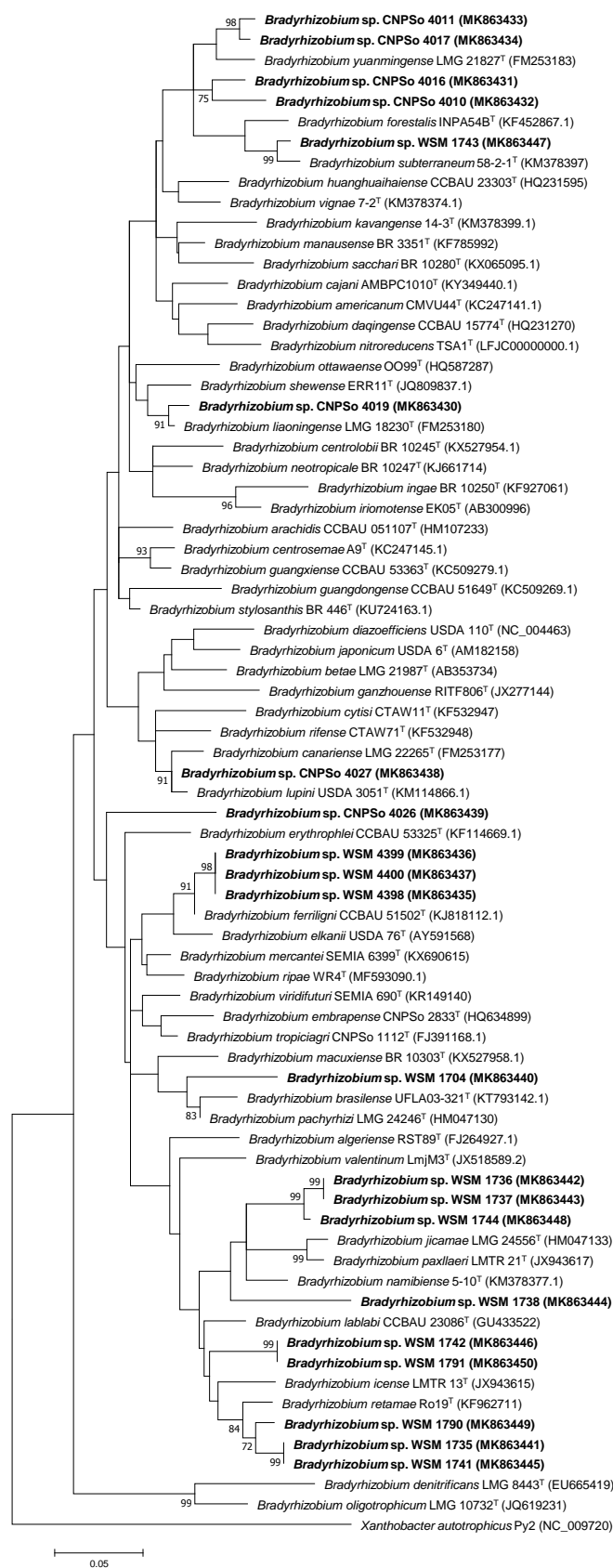


Fig. S5. Maximum-likelihood phylogeny based on the symbiotic gene *recA*, using the Tamura 3-parameter +G +I model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

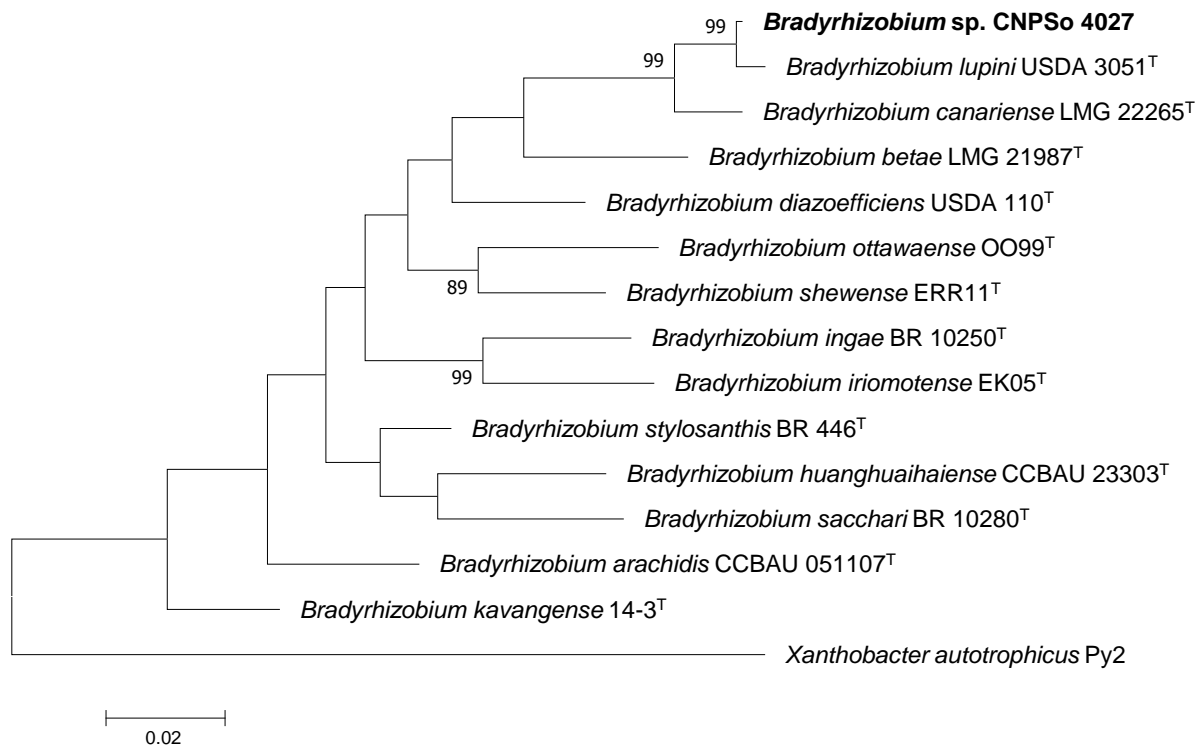


Fig. S6. Maximum-likelihood phylogeny based on the concatenated sequence (*glnII+gyrB+recA*), using the Tamura 3-parameter + I model. Accession numbers are indicated within parentheses, and strains from this study are shown in bold type. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implementação de tecnologias sustentáveis vem sendo cada vez mais exigida, principalmente devido à conscientização em relação aos danos causados ao meio ambiente como consequência da sua exploração e do crescimento populacional. Para sustentar a qualidade de vida e a segurança alimentar, bem como o meio ambiente, o aumento da população requer maior produção de alimentos, mantendo-se ou incrementando-se a qualidade nutricional. O uso do processo de fixação biológica do nitrogênio, que pode ser maximizado pela inoculação, é uma das tecnologias que proporciona melhor rendimento com baixo impacto ambiental, portanto, associado à sustentabilidade, contribui para a conservação do solo e das águas, necessitando de baixo custo de investimento quando comparado com a utilização de insumos agrícolas convencionais.

A identificação de estirpes elite para serem aplicadas com a inoculação depende de uma gama de estudos que elucidem suas diversidades e funcionalidades, bem como a interação entre os organismos envolvidos e as etapas do processo. A vasta diversidade desse grupo de microrganismos vem sendo amplamente relatada, enfatizando a importância de se isolar novas estirpes provenientes de diferentes ecossistemas. Assim, é possível acessar e registrar as características dessas bactérias visando testar suas aplicabilidades. Os estudos desenvolvidos nesta tese tiveram como objetivo acessar e descrever a diversidade de estirpes de rizóbios provenientes de diversas amostras de solos de três países.

Os resultados enfatizam a alta diversidade entre essas estirpes. Dois estudos abordaram extensas análises polifásicas visando a caracterização e descrição de duas espécies novas: *Bradyrhizobium mercantei* e *Mesorhizobium atlanticum*, sendo a última proveniente da Mata Atlântica, um dos mais importantes e mais devastados biomas brasileiros. O último estudo também utilizou ferramentas taxonômicas para investigar a diversidade presente entre 21 estirpes da África do Sul e Austrália Ocidental, apontando sete grupos como potenciais espécies novas, além de estirpes que podem representar simbiovares novos. Os três estudos contribuem na elucidação da variabilidade genética existente nas populações de rizóbios, o que mostra que podem ser diversas as funcionalidades dessas bactérias e os níveis de eficiência que carregam.