



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDERSON JOSÉ SCHERER

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO  
*Agrobacterium* ISOLADAS DE NÓDULOS RADICULARES DE  
*Phaseolus vulgaris* E *Glycine max***

---

Londrina  
2019

ANDERSON JOSÉ SCHERER

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO**  
***Agrobacterium* ISOLADAS DE NÓDULOS RADICULARES DE**  
***Phaseolus vulgaris* E *Glycine max***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria  
Co-orientadora: Dra. Jakeline Renata Marçon Delamuta

Londrina  
2019

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

SCHERER, ANDERSON JOSÉ.

Taxonomia polifásica de bactérias do gênero *Agrobacterium* isoladas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max* / ANDERSON JOSÉ SCHERER. - Londrina, 2019.  
71 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria .

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.  
Inclui bibliografia.

1. *Agrobacterium* - Tese. 2. *Rhizobium* - Tese. 3. Taxonomia - Tese. 4. Filogenia - Tese.  
I. Hungria , Mariangela . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ANDERSON JOSE SCHERER

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO**  
***Agrobacterium* ISOLADAS DE NÓDULOS RADICULARES DE *Phaseolus***  
***vulgaris* E *Glycine max***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Mariangela Hungria  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
EMBRAPA

---

Dra. Jakeline Renata Marçon Delamuta  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
EMBRAPA

---

Dr. Renan Augusto Ribeiro  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
EMBRAPA

Londrina, 19 de Fevereiro de 2019.

## **DEDICATÓRIA**

A todos que acreditaram e foram essenciais na  
realização deste trabalho, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A meus pais, por serem meu apoio nos momentos mais difíceis que enfrentei vocês são meu exemplos de honestidade e de luta.

Minhas Irmãs, Ir. Angela e Sheila Scherer, por estarem sempre preocupadas com minha saúde, pelos desabafos, e por se fazerem presentes mesmo de longe.

Pela minha sobrinha Érica, pela sua alegria e existência.

À Chefa Dra. Mariangela, é muito significativo para mim como um grande admirador tê-la como orientadora. Obrigado pelas oportunidades, puxões de orelhas e disponibilidade que permitiram que esse momento se concretizasse.

A Dra. Jakeline pela Paciência, atenção e dedicação em TODAS as etapas do trabalho.

Ao Dr. Renan pela disponibilidade e correções.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira, pela disponibilidade e suporte oferecido.

A Dona Rosa, Eduara e Lígia, por todo apoio e favores realizados.

A todos do laboratório de Biotecnologia do solo (EMBRAPA), tenho um imenso orgulho de ter trabalhado com vocês, obrigado por todos os cafés, risadas e por tornar os momentos difíceis mais leves.

A meus amigos, que permaneceram comigo, que me ouviram e sempre estiveram me motivando.

A Universidade estadual de Londrina, (UEL) e o programa de Pós Graduação em Microbiologia como também seu corpo docente pela dedicação.

À Bolsa anual oferecida pela CAPES.

À Embrapa, pela estrutura e oportunidade.

Grato!

“São as nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos”.

Alvo Dumbledore , Harry Potter e a Câmara Secreta (2002).

SCHERER, Anderson José. **Taxonomia polifásica de bactérias do gênero *Agrobacterium* isoladas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max***. 2019. 71 p Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Os membros do gênero *Agrobacterium* são Gram-negativos, alfaproteobactérias associadas a solo e plantas, e conhecidos por sua patogenicidade e pelo uso como ferramenta biotecnológica. A ciência taxonômica faz uso de uma série de dados para a validação dos táxons. O presente estudo utilizou isolados de nódulos de soja (*Glycine max*) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) pertencentes à “Coleção de Bactérias Diazotróficas e Promotoras de Crescimento Vegetal da Embrapa Soja” e que, em estudos prévios, apresentaram propriedades transitórias entre *Rhizobium* e *Agrobacterium*. Foram avaliadas propriedades morfofisiológicas (morfologia de colônias, crescimento sob diferentes condições, perfil de ácidos graxos), genéticas (perfil de BOX-PCR, conteúdo G+C, sequenciamento do genoma) e filogenéticas (análise dos genes 16S RNAr e de genes *housekeeping*), visando uma análise polifásica. A estirpe CNPSo 3391, isolada de um nódulo de soja na província de Zambézia, em Moçambique, foi identificada como *Agrobacterium deltaense*, cuja estirpe tipo foi isolada de um nódulo de *Sesbania cannabina* na China. Já para a estirpe CNPSo 2736<sup>T</sup>, isolada de nódulo de feijoeiro inoculado com um solo do Mato Grosso do Sul, os resultados indicam que ela deve representar uma nova espécie, para a qual foi sugerido o nome de *Agrobacterium fabaceae*. Quando os postulados de Koch foram seguidos, a habilidade de ambas estirpes nodular as leguminosas hospedeiras não foi confirmada, indicando que essas bactérias podem ser endofíticas, ou que adquirem facilmente um plasmídeo simbiótico que permite a nodulação temporária. A condução de estudos sobre o papel dessas estirpes na simbiose com leguminosas é de grande relevância, pois pode fornecer informações valiosas sobre a evolução de bactérias simbióticas e patogênicas.

**Palavras-chave:** *Agrobacterium*. *Rhizobium*. Taxonomia. Filogenia. MLSA. ANI.

SCHERER, Anderson José. **Polyphasic Taxonomy of bacteria belonging to the genus *Agrobacterium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max***. 2019. 71 f Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Members of the genus *Agrobacterium* are Gram-negative, Alphaproteobacteria, associated with soil and plants and known by their pathogenicity and as a tool in biotechnology. The taxonomy science uses a series of data for the validation of taxons. The present study used isolates from nodules of soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) belonging to the “Culture Collection of Diazotrophic and Plant-Growth Promoting Bacteria of Embrapa Soja” that, in previous studies, have shown transient properties between *Rhizobium* and *Agrobacterium*. Morphophysiological (colony morphology, growth under different conditions, fatty acids profile) and genetic (BOX-PCR profile, analysis of the 16S rRNA and housekeeping genes, genome sequencing) properties were evaluated, aiming at a polyphasic analysis. Strain CNPSo 3391, isolated from a soybean nodule in the province of Zambézia, Mozambique, was identified as *Agrobacterium deltaense*, whose type strain was isolated from a nodule of *Sesbania cannabina* in China. However, for strain CNPSo 2736<sup>T</sup>, isolated from a nodule of common bean inoculated with a soil from Mato Grosso do Sul, the results indicated that it might represent a new species, for which the name of *Agrobacterium fabaceae* was suggested. When Koch's postulates were followed, the ability of both strains to nodulate the host legumes was not confirmed, indicating that these bacteria could be nodule endophytes, or that they could easily acquire a symbiotic plasmid that would allow them to temporarily nodulate the legume. The conduction of studies about the role of these strains in the symbiosis with legumes is of great relevance, as they can give important information about the evolution of symbiotic and pathogenic bacteria.

**Keywords:** *Agrobacterium*, *Rhizobium*, Taxonomy, Phylogeny, MLSA, ANI.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 01 -</b> Interação molecular agrobactéria-planta. ....	26
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos .....	14
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
3.1	TAXONOMIA BACTERIANA .....	15
3.2	CRITÉRIOS PARA DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE BACTERIANA.....	17
3.3	TAXONOMIA POLIFÁSICA.....	18
3.3.1	ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	18
3.3.1.1	16S RNAr.....	18
3.3.1.2	Multilocus Sequence Analysis (MLSA) .....	19
3.3.1.2.1	Importância do gene <i>recA</i> no gênero <i>Agrobacterium</i> .....	19
3.3.2	ANÁLISES GENOTÍPICAS .....	20
3.3.2.1	Determinação do Average Nucleotide Identity (ANI).....	20
3.3.2.2	Determinação da relação de bases do DNA (%G+C).....	21
3.3.2.3	Fingerprinting de DNA .....	21
3.3.2.3	1 <i>BOX-PCR</i> .....	22
3.3.3	ANÁLISES FENOTÍPICAS.....	22
3.4	O GÊNERO <i>Agrobacterium</i> .....	23
3.5	O GÊNERO <i>Rhizobium</i> .....	26
3.6	TAXONOMIA DE <i>Rhizobium</i> E <i>Agrobacterium</i> .....	27
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	40
4.1	ARTIGO 1.....	40
4.2	ARTIGO 2.....	46
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

A taxonomia ou sistemática bacteriana tem como objetivo organizar as informações obtidas em diversas análises, permitindo a identificação, nomeação e a classificação dos microrganismos. Essa ciência produziu um sistema estável e informativo, colaborando para o avanço de vários ramos da ciência, não exclusivamente da microbiologia, mas também da genômica, ecologia de microrganismos, ciências médicas, evolução, epidemiologia e biotecnologia (GODFRAY, 2002).

Por muitos anos, a sistemática conseguiu avanços modestos, por dar grande valor a testes fenotípicos e características morfológicas, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e, muitas vezes, artificiais. Quando um sistema de avaliação polifásica foi proposto, grupos taxonômicos mais rebuscados foram produzidos e, por fim, a utilização de técnicas filogenéticas estabeleceu seus padrões atuais. Vale ressaltar que as técnicas genômicas mais contemporâneas trazem maior confiabilidade nos dados e as mesmas estão sendo simplificadas com o desenvolvimento de plataformas *online* de análise genômica, ressaltando a importância da bioinformática no desenvolvimento científico e resultando em um avanço multidisciplinar.

Uma espécie bacteriana é definida de acordo com percentuais de valores de referência, por exemplo, de no mínimo 98,7% de similaridade para o gene 16S RNAr; de 94% de identidade nucleotídica para os genes de manutenção (*housekeeping*) individuais e de 96% na análise concatenada deste genes; de 95-96% na ANI (*Average Nucleotide Identity*) equivalente a 70% da hibridação de DNA-DNA, entre outros valores estabelecidos de acordo com o método definido (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; KIM et al., 2014; CHUN et al., 2018).

Mesmo após tantos anos, alguns indivíduos, por terem sua estrutura muito similar, configuram uma posição incerta. Dois gêneros bacterianos que sempre tiveram sua taxonomia controversa são o *Agrobacterium* e o *Rhizobium*, ambos com papéis relevantes na agricultura e em estudos básicos.

O gênero *Rhizobium* é conhecido pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que por ser natural e sustentável implica em ganhos ambientais e econômicos. Já o gênero *Agrobacterium* é conhecido por ser agente de doenças em plantas e pela aplicação em biotecnologia vegetal. Recentemente, houve indicação de um evento de especiação que pode ter conduzido à diferenciação do gênero *Agrobacterium* (RAMÍREZ-

BAHENA et al., 2014). Em geral, representantes de ambos os gêneros habitam o solo, hábitat detentor de uma vasta biodiversidade, muitos dos quais mantendo relações estreitas com a vegetação, bem como com a comunidade bacteriana presente no ambiente.

Sendo assim, conhecer os microrganismos que habitam o solo é essencial para a sustentabilidade dos ecossistemas, bem como para a identificação de espécies e genes de interesse biotecnológico, para o enriquecimento de coleções de culturas, entre outros. Conseqüentemente, as ferramentas de biologia molecular empregadas hoje apontam um futuro promissor para a ciência taxonômica, tornando-a mais rápida, acessível e útil.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Determinar as relações filogenéticas e a posição taxonômica de estirpes isoladas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max* que apresentam semelhança genética com *Agrobacterium*.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar as relações evolutivas, por meio de análises filogenéticas utilizando o gene 16S RNAr e genes *housekeeping* (*recA*, *glnII*, *atpD*), de estirpes isoladas do Brasil e de Moçambique sem posição taxonômica definida entre *Rhizobium* e *Agrobacterium*;
- b) Avaliar propriedades morfofisiológicas das estirpes;
- c) Avaliar a nodulação e a fixação de nitrogênio em *Macropodium atropurpureum* e *Phaseolus vulgaris*;
- d) Analisar o genoma de estirpes representativas;
- e) Realizar uma análise polifásica dos dados genotípicos, fenotípicos e filogenéticos obtidos.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. TAXONOMIA BACTERIANA

O estudo de Woese, Kandler e Wheelis (1990) definiu que os seres vivos pertencem a três diferentes domínios: Procarioto, Eucarioto e Archaea, confirmando que estruturas moleculares aferem melhor sobre as relações evolutivas, conforme haviam proposto Zuckerkandl e Pauling (1965). Cada domínio sedia seus reinos, dentro de seus filos, em sua classe, ordem, família, gênero e espécie e é nisso que se baseia a taxonomia bacteriana. Dentro desse contexto, o papel da taxonomia como ciência é classificar, identificar e nomear organismos (VANDAMME et al., 1996).

Na taxonomia, o nível mais básico de estudo para a classificação é a espécie. Quando se trata de bactéria a definição de espécie é diferente de seres superiores, pois trata-se de um ser procarionte, o que torna impossível uma classificação com base na sua sexualidade; as informações a respeito das individualidades de cada estirpe em relação às demais bactérias já descritas representa o modo de diferenciá-la. Quando a discussão é em nível de gênero, dizemos que condiz com a organização estrutural similar de um grupo de espécies. Cada espécie conta com uma estirpe tipo, que ilustra a principal representante de sua espécie. A cada espécie é atribuído um nome, que deve diferir dos já existentes (BARCELLOS et al., 2015; BRENNER; STALEY; KRIEG, 2015). O conceito de espécie bacteriana é subjetivo, sendo aceito como espécie um grupo distinto de cepas que compartilham muitas características estáveis e diferem significativamente de outros grupos bacterianos (BRENNER et al., 2005).

Lineu, em 1758 (apud BRENNER; STALEY; KRIEG, 2015; p. 6), concebeu a teoria de “divisão e denominação” (*divisio et denominatio*) que propõe um sistema binominal para a classificação atual dos organismos, onde modelos taxonômicos adotados são mais conservadores, referentes a dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que, de forma coletiva, mas não individual, atribui indicações de diferentes agrupamentos bacterianos (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2015).

O acúmulo de dados proporcionou uma nova era, a da taxonomia numérica (SNEATH e SOKAL, 1962), que objetiva diferenciar e agrupar seres bacterianos de forma homogênea dentro de seus táxons. Os dados quantitativos são tratados numericamente com o auxílio da computação, relacionando as espécies existentes e trazendo uma resolução mais confiável a análise por meio de métodos estatísticos. Todavia, é necessário um número expressivo de testes para fornecerem dados que diferenciam as espécies envolvidas.

A taxonomia bacteriana também relaciona indivíduos com a sua evolução. O estudo dessa relação é denominado filogenia, que faz uso de dados moleculares, sequenciados e previamente estudados (LUDWIG; SCHLEIFER, 1994), ou seja, afere sobre como os padrões fenéticos mudam com o tempo. As técnicas aplicadas a estudos filogenéticos têm por objetivo compreender a relação dos organismos entre si (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000), e como vieram a se diferenciar entre eles mesmos por meio de eventos naturais de recombinação e troca de material genético; essas análises são incluídas em estudos polifásicos.

Por muito tempo a taxonomia e a filogenia de procariotos teve como base a análise do gene 16S RNAr (WOESE, 1987), mas a importância de outros genes para a definição de espécies ganha mais força a partir do século XXI (NASER et al., 2007), com o desenvolvimento da metodologia de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) que passa a ser presuntivo em nível de espécie (GEVERS et al., 2005).

Novamente, a fim de eliminar erros de classificação, Colwel (1970) insere o termo “Taxonomia Polifásica”, agregando diversas informações na análise. O autor justifica que a identificação correta de um microrganismo e suas relações filogenéticas ajuda a prever propriedades genotípicas e fenotípicas esperadas para cada espécie. A taxonomia polifásica procura integrar diferentes tipos de informações: fenotípicas, genotípicas e filogenéticas do microrganismo de interesse, buscando uma classificação de consenso (GRAHAM et al., 1991; DE LAJUDIE et al., 1994; VANDAMME et al., 1996).

A técnica de hibridação DNA-DNA (HDD; DDH, *DNA-DNA hybridization*), que compara dois genomas por pareamento surge para avaliar o grau de parentesco entre espécies. Era considerada como técnica “ouro” para a delimitação de espécies, mas requer um trabalho laborioso, com custo de operação elevado, sendo necessários marcadores radioativos, além da técnica estar disponibilizada em um número restrito de laboratórios, bem como de não ser possível a criação de um banco de dados (KIM et al., 2014).

Em contrapartida, o Índice de Identidade Nucleotídica (IIN; ANI, *Average Nucleotide Identity*) entre dois genomas pode ser calculado por algumas plataformas *online*, e esse dado passou a substituir o uso da hibridação DNA-DNA, além de ser considerado agora como padrão “ouro” na delimitação de espécies. A análise genômica surgiu como uma proposta para eliminar erros taxonômicos e riscos envolvidos em técnicas muito complexas, além de possibilitar a criação de banco de dados (PILLONEL et al., 2015; SANGAL et al.,

2016), deixando claro que taxonomia microbiana atual se tornará cada vez mais dependente de toda informação genômica disponível (THOMPSON et al., 2011; SANGAL et al., 2016).

### 3.2. CRITÉRIOS PARA DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE BACTERIANA

Para a descrição de uma nova espécie bacteriana uma série de análises devem ser realizadas, definidas pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (*International Committee on Systematics of Prokaryotes – ICSP*), e pelo *Subcomitê Internacional de Taxonomia de Agrobacterium e Rhizobium*. Vale salientar que esses requisitos são atualizados à medida que metodologias mais atuais são propostas; atualmente, o genoma representa a principal fonte de informação. Segundo as revistas dentre os dados padrões mínimos exigidos estão:

- Uma estirpe tipo (= *type strain*) deve ser nomeada entre as amostras e deve estar depositada em pelo menos duas coleções de culturas de países diferentes;
- É recomendado que se utilizem pelo menos três diferentes exemplares para a descrição de uma espécie nova, que devem ser estudados com o mesmo rigor para avaliar a diversidade intraespecífica.
- Devem-se incluir análises de *fingerprinting* nos estudos genotípicos (BOX, ERIC, RAPD);
- O gene ribossomal 16S (>1300 pb) tem de ser sequenciado e depositado em algum dos bancos de dados públicos e ter disponibilizado o número de acesso para a consulta;
- Uma análise *multilocus* deve ser realizada e as sequências dos genes *housekeeping* devem ser igualmente depositadas e disponibilizadas através do número de acesso;
- Análises fenotípicas devem incluir dados quanto à morfofisiologia das espécies em estudo;
- Análises quimiotaxonômicas das estirpes também devem ser conduzidas e os dados comparados com as demais espécies relacionadas, como perfis de ácidos graxos, composição de lipídios polares, quinonas e padrões de poliaminas;
- O conteúdo G+C da nova espécie deve ser definido e o valor dado em porcentagem;
- Deve-se obter o valor de *Average Nucleotide Identity* (ANI) entre a estirpe tipo e outras estirpes mais próximas do gênero;
- É necessário o sequenciamento do genoma bacteriano, com informações suplementares, que dizem respeito ao procedimento de sequenciamento adotado e que elucidam a qualidade da sequência final obtida.

### 3.3. TAXONOMIA POLIFÁSICA

#### 3.3.1. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

##### 3.3.1.1. 16S RNAr

Por anos a classificação e a descrição de novos microrganismos triados tinha como base o cultivo em meio de cultura e metodologias próprias (FRY, 2000; SCHLEIFER, 2004; CAPORASO et al., 2012). A maioria das descrições era elaborada tomando como base características morfológicas, patogênicas e de crescimento, o que acarretou em algumas inconformidades quando à classificação (WOESE, 1987). Com o desenvolvimento da biologia molecular, novos métodos foram propostos e permitiram grande avanço na classificação de microrganismos. O avanço foi ainda maior com as técnicas de sequenciamento e a definição de que genes ribossomais tornaram-se bons marcadores biológicos. Desde então, diversos estudos têm gerado informações relevantes quanto às relações taxonômicas, ecológicas e evolucionárias entre as espécies de microrganismos (DAHLLOF, 2002; FORNEY; ZHOU; BROWN, 2004; SANGAL et al., 2016).

Na década de 1980, um novo padrão para a identificação de microrganismos começou a ser desenvolvido, indicando que as relações filogenéticas poderiam ser determinadas comparando uma parte estável do código genético (WOESE; FOX, 1977). Em bactérias, o gene 16S RNAr é o mais empregado, devido às baixas taxas de evolução deste, sendo altamente conservado (WOESE; FOX, 1977). Tais genes ribossomais também são considerados relógios moleculares, por ser possível mensurar o tempo de diferenciação de organismos levando em conta as substituições realizadas entre as bases moleculares (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

Nota-se que as taxas de substituição para o gene 16S RNAr parecem variar entre espécies bacterianas (SMIT; WIDMANN; KNIGHT, 2007). Em famílias ou gêneros em que as taxas de substituição tenham sido menores, isso se traduzirá em baixa divergência de nucleotídeos do gene em questão, o que pode gerar dúvidas sobre as relações filogenéticas, necessitando de metodologias com melhor resolução.

### 3.3.1.2. *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA)

A metodologia denominada *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) foi apresentada como um modo de mitigar os erros na utilização de genes com grau elevado de conservação em estudos taxonômicos. O MLSA foi uma técnica derivada do *Multilocus sequence typing* (MLST), empregada em estudos epidemiológicos (GEVERS et al., 2005).

O MLSA consiste de uma análise conjunta de múltiplos genes (*loci*), relacionados com o metabolismo basal das bactérias (genes *housekeeping*) sendo, portanto, bastante conservados e presentes em quase todas as espécies de procariotos, permitindo a avaliação taxonômica e evolutiva entre os organismos em estudo, e conseguindo apontar diferenças significativas, inclusive entre espécies bastante próximas (MARTENS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009; GLAESER; KÄMPFER, 2015; DALL'AGNOL et al., 2016).

Como são utilizados três ou mais genes, os mesmos são analisados conjuntamente (concatenados), de forma que os efeitos de recombinação genética ou transferência horizontal que também podem ocorrer nessas sequências sejam “tamponados” e não prejudiquem a análise final.

A avaliação filogenética é feita com base nas diferenças encontradas entre as sequências de seus genes *housekeeping*, os quais devem estar presentes em todos os microrganismos estudados, a resolução filogenética é determinada por vários cálculos matemáticos e estatísticos de evolução já estabelecidos. Os principais requisitos para a aplicação dessa metodologia é que os genes escolhidos estejam no genoma em uma única cópia, distribuídos em uma distância de, no mínimo, 100 kb, apresentem extensão nucleotídica suficiente para permitir o sequenciamento e contenham informações suficientes para serem congruentes ao 16S RNAr (ZEIGLER, 2003; THOMPSON et al., 2005; DALL'AGNOL et al., 2016).

Dentre os genes *housekeeping* utilizados para estudos na família *Rhizobiaceae*, por exemplo, podem-se citar os *glnII*, *gyrB*, *atpD*, *rpoB*, *thrC* e *recA* (GAN; SAVKA, 2018).

#### 3.3.1.2.1. Importância do gene *recA* no gênero *Agrobacterium*

O gene *recA* codifica uma enzima importante envolvida na recombinação homóloga no reparo de DNA (KOWALCZYKOWSKI et al., 1994). Um mutante *recA* é caracterizado por sua alta sensibilidade à luz UV, além de ser deficiente em recombinação, uma característica desejável para estudos genéticos envolvendo mutações em cromossomos

ou plasmídeos relevantes (KANIE et al., 2007). O gene *recA* foi incorporado como um dos principais genes para tipagem multilocus (MLSA) (LLOYD; SHARP, 1993; SAKAMOTO; OHKUMA, 2011; DELAMUTA et al., 2012; HUO et al., 2017; GAN; SAVKA, 2018).

Este gene é muito importante para o gênero *Agrobacterium*, onde a filogenia formada por ele é congruente à resolução filogenética do 16S RNAr e, também, ao gene de especiação do gênero, o gene *telA*.

A presença de um segundo cromossomo em bactérias não é um evento comum, e quando acontece deve-se a um ganho ancestral (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2014), esse evento acontece no gênero *Agrobacterium* onde encontra-se um segundo cromossomo linear (cromídeo), do inglês *chromid*, nome criado para diferir de cromossomo e plasmídeo (HARRISON et al., 2010). Em *Agrobacterium* tem-se, também, o gene *telA*, que codifica a enzima protelomerase, (COSTECHAREYRE et al., 2010); essa aquisição resulta na formação de um *hairpin* que é ligado covalentemente nas extremidades do cromídeo (SHI; HUANG; AIHARA, 2013), reforçando que esse gene é uma marca de especiação das espécies do gênero e provavelmente tenha originado esse clado. (COSTECHAREYRE et al., 2010; RAMÍREZ-BAHENA et al., 2014; GAN; SAVKA, 2018). A análise filogenética final baseada no gene *recA* de 138 estirpes de 13 espécies de *Agrobacterium* dá suporte ao uso desse gene marcador para especiação do gênero (COSTECHAREYRE et al., 2010; RAMÍREZ-BAHENA et al., 2014).

O gene *recA* é um importante marcador de *Agrobacterium*, sendo atribuído, entre as suas vantagens, permitir o diagnóstico epidemiológico das doenças que são relacionadas às estirpes patogênicas, e comprovando a eficiência nos estudos de análises forenses (COSTECHAREYRE et al., 2010).

### 3.3.2. ANÁLISES GENOTÍPICAS

#### 3.3.2.1. Determinação do *Average Nucleotide Identity* (ANI)

As plataformas atuais de sequenciamento vêm permitindo um aumento significativo no número de dados gerados; com isso, houve um crescimento significativo nos estudos à medida que o sequenciamento foi se tornando mais acessível, facilitando o acesso a diversos genomas. O sequenciamento dos genomas permitiu a substituição da metodologia de hibridação do DNA-DNA, e o ANI tem sido o algoritmo mais utilizado para identificação e análises da relação genômica geral entre duas estirpes (BEAZ-HIDALGO et al., 2015; YI; CHUN, 2015).

Para o cálculo de identidade taxonômica e para a obtenção do valor de ANI é necessário apenas a comparação de dois genomas, e esse procedimento pode ser realizado em plataformas *online*. O ANI *calculator* foi desenvolvida por um grupo de pesquisa da Georgia, EUA (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2016) (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) e é um exemplo de ferramenta de fácil acesso e uso gratuito, que vem sendo empregada com sucesso; na plataforma é necessário apenas realizar o *upload* das duas sequências a serem comparadas e, em pouco tempo (minutos), o valor de ANI é disponibilizado.

O ANI pode ser utilizado para delinear a distância intergenômica entre espécies procarióticas estreitamente relacionadas (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2016), e a confiabilidade do resultado está diretamente relacionada com a quantidade e qualidade dos fragmentos de DNA alinhados (GORIS et al., 2007, RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009). O valor de ANI de 95-96% tem sido considerado como limite entre espécies, sendo um poderoso descritor da relação genética entre pares de genomas, sendo correspondente a 70% da hibridação DNA-DNA, valor de referência para considerar duas estirpes como sendo da mesma espécie (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006; GORIS et al., 2007; CHUN; RAINEY, 2014).

### 3.3.2.2. Determinação da relação de bases do DNA (%G+C)

O estudo da composição de bases do DNA também é uma ferramenta útil e um modo rotineiro de distinguir estirpes fenotipicamente semelhantes, mas geneticamente não relacionadas (BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992). A determinação da porcentagem molar de guanina (G) e citosina (C) representa um método padrão para descrição de novas espécies. (BARCELLOS et al., 2015). É, geralmente, aceito que microrganismos mostrando diferenças em mais de 3% de CG não devem ser considerados da mesma espécie, e aqueles com mais de 10% de diferença no padrão G+C não devem ser classificados dentro do mesmo gênero (BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992).

### 3.3.2.3. *Fingerprinting* de DNA

As análises de *Fingerprinting* são baseadas na amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) de determinadas regiões conservadas do DNA, ou na digestão do produto de PCR com enzimas de restrição e após a amplificação, os produtos são submetidos à eletroforese em gel de agarose. Essas técnicas

permitem a obtenção de “impressões digitais” ou *fingerprintings* dos microrganismos, em que a separação de fragmentos com base polimorfismo gera um padrão para cada estirpe, demonstrando diversidade interespecífica (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013).

Dentre as metodologias, podem-se citar, como exemplo, PCR de sequências repetitivas de DNA (rep-PCR usando os *primers* REP, ERIC, BOX), PCR com *primers* randômicos (RAPD, AP-PCR), e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

#### 3.3.2.3.1 BOX-PCR

Para a obtenção dos chamados *fingerprinting* a técnica de BOX PCR é uma das mais utilizadas. A região BOX é organizada por três unidades, *boxA*, *boxB* e *boxC*, que contêm 54, 43 e 50 pares de bases, pb, respectivamente (MARTIN et al., 1992). Os elementos de *boxB* e *boxC* não se encontram conservados em todas as bactérias, já a subunidade *boxA* é altamente conservada e conta com, aproximadamente, 25 cópias no genoma. Essa região BOX é comumente utilizada, por ser confiável na diferenciação de estirpes e haver repetibilidade do método (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995); a amplificação e a formação dos *fingerprints* é intermediada por um único *primer*.

#### 3.3.3. ANÁLISES FENOTÍPICAS

Diferente dos dados filogenéticos e genotípicos, os métodos fenotípicos têm como objetivo descrever características morfofisiológicas dos microrganismos; dessa maneira, envolvem a observação da manifestação, nas colônias, do crescimento, tamanho, forma, cor, alterações no pH do meio; dados de crescimento da estirpe em meio com NaCl, ou contendo enzimas relacionadas, ou sob diversos valores de pH e temperaturas; tolerância ou sensibilidade a antibióticos; uso de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, entre outros (VANDAMME et al., 1996). Esses dados não são conclusivos, porém, alimentam as informações de base taxonômica referente a como manusear e utilizar o organismo.

Outra forma de avaliação, que complementa os dados da descrição taxonômica se baseia na composição lipídica bacteriana (SLABBINCK et al., 2010). O perfil de ácidos graxos é avaliado para definir a configuração estrutural de alguns grupos bacterianos, frente ao fato de possuírem tipos específicos destes compostos, formando biomarcadores taxonômicos. Comparando perfis obtidos de estirpes desconhecidas com

aqueles obtidos de espécies já descritas, é possível atribuir às avaliações funções de identificação e classificação (FERNANDES; CHAER, 2010).

### 3.4. O GÊNERO *Agrobacterium*

O nome *Agrobacterium* foi proposto em 1942 por Conn (apud ZAHRADNÍK et al., 2018) e, inicialmente, as bactérias foram classificadas de acordo com as propriedades patogênicas, fisiologia ou fenotipagem, por exemplo, *A. tumefaciens* para a doença da galha de coroa, *A. rhizogenes* para raiz pilosa, *A. vitis* para infecções em uva (*Vitis* spp.) e *A. radiobacter* para não patogênicos. Em outra classificação, com base em propriedades fisiológicas e bioquímicas, as estirpes de *Agrobacterium* foram divididas em três biovars, I II e III (MORTON; FUQUA, 2012); contudo, a classificação por biovar se tornou muito controversa, pois os plasmídeos envolvidos são conjugativos e alguns indivíduos se alojavam em posições intermediárias (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

*Agrobacterium* são bactérias Gram-negativas, com forma de bacilo, e com temperatura de crescimento ótima entre 25°C a 28°C. Recentemente, *Agrobacterium* foi redefinida como um ramo monofilético da família *Rhizobiaceae*, caracterizado por uma arquitetura específica de núcleo-genoma, consistindo de um cromossomo circular e um grande cromossomo linear que possui um grampo de DNA (*hairpin*) em sua extremidade (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2014).

O gênero é classificado como pertencente ao reino: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alphaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales; Família: Rhizobiaceae. Os membros bacterianos são predominantemente habitantes de solo e associados a plantas. São reconhecidos, principalmente, como patógenos de plantas que ocorrem em numerosas espécies de importância agrícola, mas o gênero também inclui estirpes não patogênicas.

Estirpes fitopatogênicas podem causar a doença da galha-da-coroa (ESCOBAR; DANDEKAR, 2003), que é determinada pela presença do plasmídeo indutor de tumor (Ti) em seu genoma (SUZUKI et al., 2009), enquanto que estirpes que abrigam o plasmídeo indutor de raiz (Ri) são os agentes causadores da doença de raiz pilosa (ESCOBAR; DANDEKAR, 2003; OTTEN; BURR; SZEGEDI, 2008). As estirpes de *Agrobacterium* também podem carregar um plasmídeo simbiótico (Sym) e nodular leguminosas (PLATT et al. 2014; ZHAO et al., 2014). Além disso, há estirpes identificadas como patógenos humanos mantendo relações com infecções nosocomiais (AUJOULAT et al., 2011) estirpes que atuam na biotransformação e degradação de compostos (WANG, et al., 2012; LE et al., 2014; CAMPILLO et al., 2014) e, com frequência, há estirpes utilizadas em

biotecnologia para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (WIESER; HEINZMANN; KIENER, 1997; TZFIRA; CITOVSKY, 2006; LE et al., 2014)

O gênero em questão é muito conhecido por suas divergências taxonômicas. Em 2018, estava composto por 13 espécies: *Agrobacterium arsenijevicii*, *A. larrymoorei*, *A. nepotum*, *A. pusense*, *A. radiobacter*, *A. rubi*, *A. skierniewicense*, *A. rosae*, *A. bohemicum*, *A. deltaense*, *A. salinitolerans*, *A. albertimagni* e “*A. fabrum*” (KUZMANOVIĆ et al. 2015, 2018; MOUSAVI et al. 2015; YAN et al. 2017; ZAHRADNÍK et al. 2018).

*A. tumefaciens* (Biovar 1), como maior representante do gênero, foi muito estudada, e passou de biovar para espécies individuais, e de espécies para um complexo. Sabe-se que não se trata de uma única estirpe/espécie, mas sim de um grupo de estirpes contendo pelo menos 11 diferentes espécies taxonômicas (COSTECHAREYRE et al. 2010; PANDAY; SCHUMANN DAS et al. 2011; KUZMANOVIĆ et al. 2015) sendo acordado, então, que o conjunto de diferentes genomas, previamente denominado *A. tumefaciens*, deveria ser denominado como um “complexo de espécies de *A. tumefaciens*”, até que todos os representantes sejam devidamente nomeados. Há pelo menos nove espécies genômicas no complexo *A. tumefaciens* que ainda devem ser melhor investigadas: (G1, G3, G5, G6, G7, G9, G13, G8 (*A. fabrum*) e G15 (*A. viscosum*) (COSTECHAREYRE et al., 2010; RAMÍREZ-BAHENA et al., 2014). Apenas as espécies genômicas G2 (*A. pusense*), G4 (*A. radiobacter*) e G14 (*A. nepotum*) foram devidamente estudadas (KUZMANOVIĆ et al. 2015).

Algumas espécies de agrobactérias avirulentas abrigam plasmídeos catabólicos, que conferem a capacidade de aproveitar os benefícios da patogênese iniciada por agrobactérias virulentas ao catabolizar opinas (MERLO; NESTER, 1977; DESSAUX et al., 1998; WETZEL et al., 2014). Opinas são compostos químicos de baixo peso molecular que são catabolizados pelo T-DNA de plasmídeos Ti e Ri, e servem como fonte de C e N para a bactéria, proporcionando sua manifestação. O tipo de opina produzido e secretado pelas células do tumor é determinado pela bactéria que está induzindo a formação do mesmo (figura 01) (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003; BARTON; FUQUA; PLATT 2017).

Os plasmídeos de espécies patogênicas (Ti e Ri) contêm uma região denominada de T-DNA e essa é a região transferida para a planta hospedeira. Essa comunicação ocorre pela capacidade da bactéria reconhecer açúcares e compostos fenólicos liberados pela planta frente a qualquer sinal de injúria ou condição adversa em que se encontrar; essa sinalização é denominada de quimiotatismo positivo e, em seguida, ocorre a ativação dos genes de virulência (*vir*). Essa ativação provoca uma cascata de reações que

desencadeiam na transferência do T-DNA para o vegetal receptor, aumentando a produção de promotores de crescimento como citocininas e auxinas que estimulam o crescimento celular desenfreado (figura 01) (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

Estudos conduzidos com *Nicotiana*, *Linaria* e *Ipomoea* confirmam que a transferência para o genoma da planta mediada pelo T-DNA de *Agrobacterium* ocorre de forma regular (WHITE et al., 1983; INTRIERI; BUIATTI, 2001; MATVEEVA et al., 2012; PAVLOVA; MATVEYEVA.; LUTOVA, 2014; KYNDT et al., 2015). Uma vez em contato com a célula vegetal, as bactérias sintetizam filamentos de celulose que estabilizam a ligação inicial, propiciando uma melhor fixação entre a bactéria e a célula hospedeira (MATTHYSSE et al., 2000). Desta forma, a motilidade e o quimiotatismo têm um papel fundamental no processo inicial de infecção, visto que, sem o contato bactéria-célula vegetal, o evento de transferência de DNA não ocorreria (WINANS, 1992; SHENG; CITOVSKY, 1996).

Assim como ocorre em outros procariontes, em *Agrobacterium* também ocorre transferência horizontal de genes (THG) (TZFIRA; CITOVSKY, 2006; GELVIN, 2009). A THG pode ser definida como a transferência de material genético de um organismo para outro que não é seu descendente (QUISPE-HUAMANQUISPE; GHEYSEN; KREUZE, 2017), sendo um evento comum entre procariontes. A aquisição de patogenicidade, resistência a antibióticos e vias metabólicas são exemplos de características importantes que ocorrem via THG (MAIDEN et al., 1998; HOTOPP et al., 2007), dessa maneira, as estirpes podem vir a perder ou ganhar genes de patogenicidade. De maneira geral, tanto as espécies virulentas, como as não virulentas, estão relacionadas ao ambiente onde são encontradas e aos processos ligados à infecção, com a maquinaria presente em cada espécie referente aos seus respectivos plasmídeos e à produção de opinas (PLATT et al., 2014).

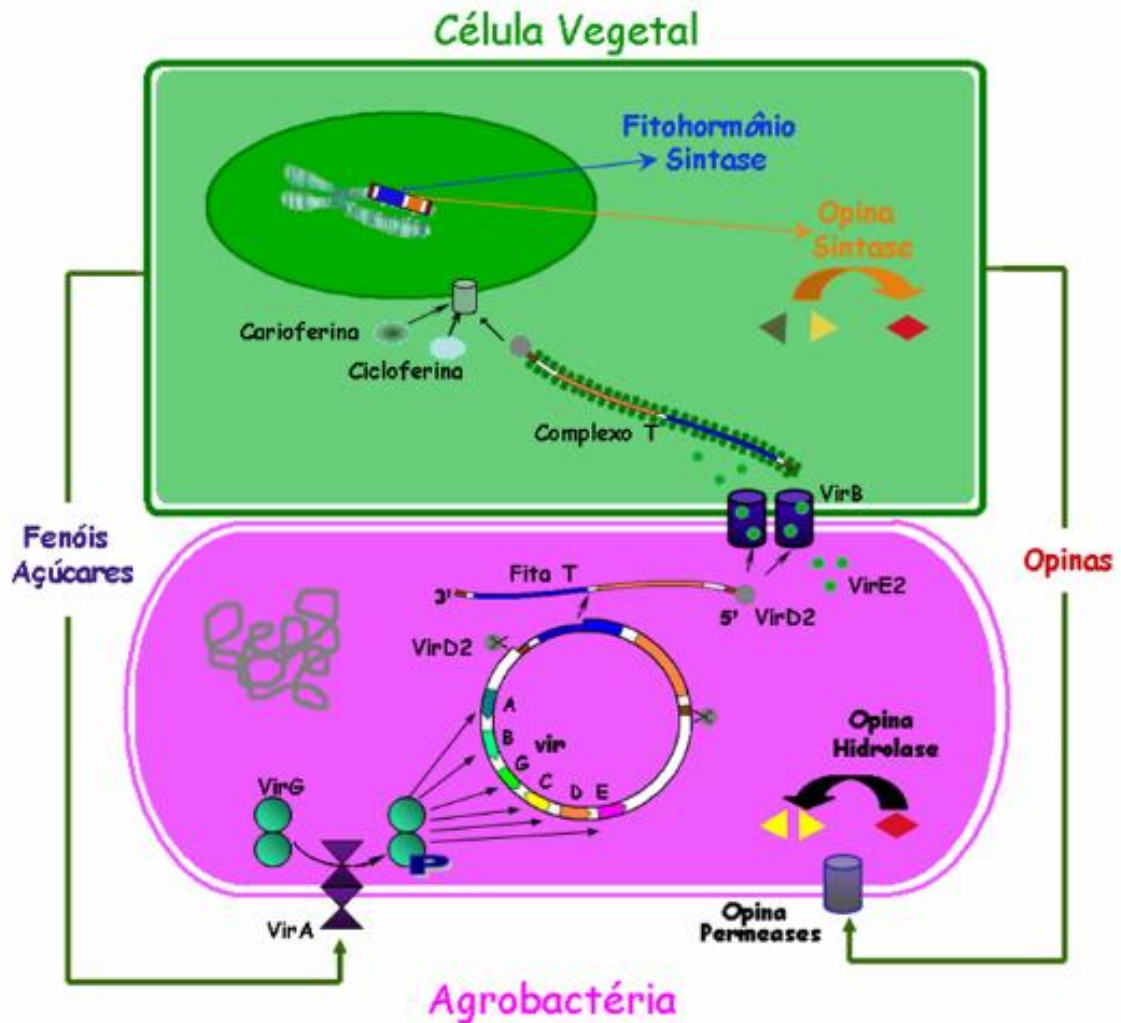


Figura 01. Interação molecular agrobactéria-planta (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004).

### 3.5. O GÊNERO *Rhizobium*

Descrito pela primeira vez como *Bacillus radicola* e renomeado por Frank (1889) como *Rhizobium leguminosarum* (BEIJERINCK, 1888, FRANK, 1989; apud WILLEMS, 2006) o gênero *Rhizobium* pertence à família Rhizobiaceae e é um dos grandes protagonistas em relação à nodulação e ao processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esse foi o primeiro gênero de rizóbio, alfa-rizóbios e, em 2018, outros gêneros descritos de bactérias diazotróficas dessa família são: *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Pararhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Shinella* (VELÁZQUEZ et. al., 2017).

Na presente classificação taxonômica, o gênero *Rhizobium* encontra-se dentro do Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rhizobiales, Família Rhizobiaceae (GARRITY; HOLT, 2001).

Bactérias do gênero *Rhizobium* são caracterizadas pelo crescimento rápido em meio cultura contendo extrato de levedura e manitol (*yeast-mannitol-agar*, YMA) (pH 6-7), tempo de geração de 3 a 5 h, temperatura ideal de crescimento entre 25-30°C; apresentam tamanho de colônias entre 2-4 mm de diâmetro e reação ácida em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono (OLIVEIRA et al., 2007; KUYKENDALL et al., 2005).

As bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* também são denominadas simbióticas; elas invadem as células da planta hospedeira alterando-as estruturalmente e funcionalmente, acarretando a formação de novos órgãos na raiz e, algumas vezes, no caule, denominados nódulos (POSTGATE, 1982; VARGAS; HUNGRIA, 1994). A formação dos nódulos é característica de diversas espécies da família Leguminosae (HUNGRIA et al., 1994; MOULIN et al., 2001; SANTOS; REIS, 2008). O gênero engloba um grupo de bactérias do solo que possuem habilidade de induzir a formação de nódulos nas raízes e, em alguns casos, no caule de plantas leguminosas, onde convertem o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em formas assimiláveis pelas plantas hospedeiras (HUNGRIA et al., 1994). Representa um dos gêneros mais importante para a agricultura.

Para avaliar os aspectos relacionados à simbiose, são realizadas análises de filogenia dos genes de nodulação, que estão localizados em elementos como megaplasmídeos e plasmídeos, que são transferíveis, bem como em ilhas simbióticas, também transferíveis (SANTOS; REIS, 2008) e são responsáveis pelos processos de nodulação. O gene *nodC* representa o marcador simbiótico mais utilizado para estudos de diversidade e evolução envolvendo genes de nodulação (LAGUERRE et al., 2001; BONTEMPS et al., 2016). A FBN é possível porque essas bactérias sintetizam uma enzima chamada dinitrogenase, capaz de transportar elétrons até a redução completa do N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub> (amônia); o gene utilizado nos estudos para avaliar a presença da nitrogenase em estudos de diversidade é o *nifH* (ZEHR et al., 2003). Dentre os bons modelos para estudos quanto à formação de estruturas nodulíferas e fixadores de nitrogênio têm-se o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e o siratro (*Macroptilium atropurpureum*) (MELLONI et al., 2006; LIMA, 2009).

### 3.6. TAXONOMIA DE *Rhizobium* E *Agrobacterium*

A falta de concordância entre as características bioquímicas, os perfis de ácidos graxos e a hibridação DNA-DNA fazia com o que os dados disponíveis a respeito dos gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium* não oferecessem um posicionamento taxonômico consolidado. Por esse motivo, Young e colaboradores (2001) publicaram um estudo sobre

incongruências em suas classificações, e indicaram que os indivíduos do gênero *Agrobacterium* deveriam ser realocados no gênero *Rhizobium*.

O trabalho de Young e colaboradores gerou uma repercussão da comunidade científica e Farrand, van Berkum e Oger (2003), juntamente com uma lista de pesquisadores consignatários, responderam à proposta apresentada pelos colegas, citando evidências que sustentam a manutenção dos gêneros de forma separada, afirmando que os gêneros são distinguidos pelo seu fenótipo e sua estrutura cromossômica. No mesmo ano, Young e equipe (2003) responderam em réplica à nota de Farrand e colaboradores (2003) indicando que, além das irregularidades apresentadas, a proposta de união dos gêneros iria de acordo com Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias, ressaltando que a classificação por conta da atividade patogênica de *Agrobacterium* tem sido problemática, justificando que os sistemas de virulência bacteriano são codificados em plasmídeos e os mesmos podem ser perdidos em algumas situações.

Na tentativa de discriminar indivíduos do gênero *Agrobacterium* pelas limitações de técnicas como a hibridação DNA-DNA, a análise do 16S rRNA e o AFLP, que não conseguem definir, com precisão, a posição taxonômica de indivíduos intimamente relacionados, Costechareyre e equipe (2010), utilizaram o gene *housekeeping recA* para elucidar o agrupamento de todas as espécies e genomoespécies (*genomospecies*) do grupo *Agrobacterium*. As sequências *recA* identificaram espécies relacionadas dentro de um grupo (*A. larrymoorei*, *A. vitis*, *A. rubi* e *R. rhizogenes*) e, ainda, permitiram a identificação das genomoespécies G1 a G9 do complexo de espécies *tumefaciens*.

Aplicando técnicas de eletroforese em gel de campo pulsado e PCR, Ramírez-Bahena e colaboradores (2014) conseguiram identificar a presença de estruturas exclusivas (*telA*) nos indivíduos do gênero *Agrobacterium*, as quais formam um clado monofilético.

Corroborando com os dados apresentados e usando a técnica de MLSA de seis genes *housekeeping* entre 114 indivíduos dos gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium*, Mousavi e colaboradores (2014), definiram novos gêneros para indivíduos erroneamente classificados na família Rhizobiaceae. Criando o gênero *Neorhizobium* para os antigos *Rhizobium galegae* (LINDSTRÖM, 1989), *R. huautlense* (WANG et al., 1998) e *R. alkalisoli* (LU et al., 2006); no mesmo trabalho, Mousavi e colaboradores (2014) observaram que *Agrobacterium vitis* deveria ser reclassificada por estar agrupado com representantes do *Allorhizobium*. Outro caso foi na concepção de *A. radiobacter*, preliminarmente *A. tumefaciens*, que passou a ser denominado Complexo de *A. tumefaciens*.

Com o desenvolvimento de novas técnicas de diferenciação bacteriana, foi possível obter grandes avanços na classificação das espécies, tornando-as mais apuradas; como exemplo, pode-se citar o gênero *Agrobacterium*, que antes era considerado de classificação incerta, mas que, atualmente, pode ser definido como um gênero monofilético da família Rhizobiaceae.

### 3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. Molecular biology of the infection process by *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003.
- AUJOULAT, F.; JUMAS-BILAK, E.; MASNOU, A.; SALLÉ, F.; FAURE, D.; SEGONDS, C.; MARCHANDIN, H.; TEYSSIER, C. Multilocus sequence-based analysis delineates a clonal population of *Agrobacterium (Rhizobium) radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)* of human origin. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 10, p. 2608-2618, 2011.
- BARCELLOS, F.G.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BATISTA, J.S.S.; RIBEIRO, R.A. Taxonomia bacteriana – aspectos atuais e perspectivas. In: YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M.C.; NOGUEIRA, M.A. (Orgs.) **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: Eduel, 2015. (ISBN 978-85-7846-359-5).
- BARTON, I. S.; FUQUA, C.; PLATT, T. G. Ecological and evolutionary dynamics of a model facultative pathogen: *Agrobacterium* and crown gall disease of plants. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 1, p. 16-29, 2017.
- BARROS, L. M. G.; VIANA, A. A. B.; CARNEIRO, M. Aprendendo com as Agrobactérias. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 15-27, 2004.
- BEAZ-HIDALGO, R.; HOSSAIN M. J.; LILES M. R.; FIGUERAS M. J. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0115813, 2015.
- BONTEMPS, C.; ROGEL, M. A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A.; MOODY, S.; SIMON, M. F.; GREYER, R. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacteria rhizobium symbionts. **New Phytologist**, v. 209, n. 1, p. 319–333, 2016.
- BRENNER, D. J.; STALEY, J. T.; KRIEG, N. R. Classification of Prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 2nd ed., vol. 2, parts A, B and C, Springer-Verlag, New York, NY. p. 1-9, 2005.
- BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-246, 1992.
- CAMPILLO, T.; RENOUD, S.; KERZAON, I.; VIAL, L.; BAUDE, J.; GAILLARD, V.; BELLVERT, F.; CHAMIGNON, C.; COMTE, G.; NESME, X.; LAVIRE, C.; HOMMAIS, F. Analysis of hydroxycinnamic acid degradation in *Agrobacterium fabrum* reveals a coenzyme A-dependent, beta-oxidative deacetylation pathway. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n. 11, p. 3341-3349, 2014.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D., HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v.6, p. 1621–1624, 2012.

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, n. 2, p. 316-324, 2014.

CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; DA COSTA, M. S.; ROONEY A. P.; YI H.; XU X.; 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, n. 1, p. 461-466, 2018.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n. 1, p. 410-433, 1970.

COSTECHAREYRE, D.; RHOUMA, A.; LAVIRE, C.; PORTIER, P.; CHAPULLIOT, D.; BERTOLLA, F.; BOUBAKER, A.; DESSAUX, Y.; NESME, X. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 862-872, 2010.

DAHLLOF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 213–217, 2002

DALL´AGNOL, R. F. **Taxonomia e filogenia de alfa e beta-rizóbios provenientes de solos dos Cerrados e da Mata Atlântica**. 217f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2016.

DALL´AGNOL, R.F.; PLOTEGHER, F.; SOUZA, R.C.; MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian “Cerradão”. **FEMS Microbiology Ecology**, v.92, fiw108, p.1-14, 2016.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 715-733, 1994.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P., BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 698-710, 2012.

DESSAUX, Y.; PETIT, A.; FARRAND, S. K.; MURPHY, P. J. Opines and opine-like molecules involved in plant-Rhizobiaceae interactions. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Eds). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Springer, , 1998. p. 173-197.

ESCOBAR, M. A.; DANDEKAR, A. M. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 8, p. 380-386, 2003.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. **Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)**, v. 42, n. 1, p.19-33, 2013.

- FARRAND, S. K.; VAN BERKUM, P. B.; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable member of the family Rhizobiaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1681–1687, 2003.
- FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. **Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 163).
- FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 210-220, 2004.
- FRY, J. Bacterial diversity and ‘unculturables’. **Microbiology Today**, v. 27, p. 86–188, 2000.
- GAN, H. M.; SAVKA, M. A. One more decade of *Agrobacterium* taxonomy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1-14. 2018. (online, doi: 10.1007/82\_2018\_81).
- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D. R.; CATENHOLZ, R. W. (eds.) **Bergey’s manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 119-166.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium* in the genomics age. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 1665-1676, 2009.
- GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.
- GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237-245, 2015.
- GODFRAY, H. C. J. Challenges for taxonomy. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 17, 2002.
- 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, n. 1, p. 81-91, 2007.
- GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J.; KEYSER, H. H.; BARNET, Y. M.; BRADLEY, R. S.; COOPER, J. E.; YOUNG, J. P. W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 582-587, 1991.
- HARMSSEN, D.; KARCH, H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. **ASM News**, v. 70, n. 1, p.19-24, 2004.
- HARRISON, P. W.; LOWER, R. P.; KIM, N. K.; YOUNG, J. P. W. Introducing the bacterial ‘chromid’: not a chromosome, not a plasmid. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 141-148, 2010.

- HOTOPP, J. C. D.; CLARK, M. E.; OLIVEIRA, D. C.; FOSTER, J. M.; FISCHER, P.; TORRES, M. C. M.; GIEBEL, J. D.; KUMAR, N.; ISHMAEL, N.; WANG, S.; INGRAM, J.; NENE, R. V.; SHEPARD, J.; TOMKINS, J.; RICHARDS, S.; SPIRO, D. J.; GHEDIN, E.; SLATKO, B. E.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1753-1756, 2007.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p. 9-89.
- HUO, Y. B.; CHAN, Y.; LACAP-BUGLER, D. C.; MO, S.; WOO, P. C.; LEUNG, W. K.; WATT, R. M. Multilocus sequence analysis of phylogroup 1 and 2 oral treponeme strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 83, n. 3, p. e02499-16, 2017.
- INTRIERI, M. C.; BUIATTI, M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 100-110, 2001.
- KANIE, S., HORIBATA, K., KAWANO, M., ISOGAWA, A., SAKAI, A., MATSUO, N.; NAKANISHI, M.; HASEGAWA, K.; YOSHIYAMA, K.; MAKI, H. Roles of *recA* protein in spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. **Genes & Genetic Systems**, v. 82, n. 2, p. 99-108, 2007.
- 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, n. 2, p. 346-351, 2014.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, p. 408-418, 1995.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. The bacterial species definition in the genomic era. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1475, p. 1929-1940, 2006.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C.; DIXON, D. A.; EGGLESTON, A. K.; LAUDER, S. D.; REHRAUER, W. M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 401-465, 1994.
- KUYKENDALL, L.; YOUNG, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. *Rhizobium*. **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Proteobacteria**. v.2, Part C. Springer, 2005. p. 325-340.
- KUZMANOVIĆ, N.; PUŁAWSKA, J.; PROKIĆ, A.; IVANOVIĆ, M.; ZLATKOVIĆ, N.; JONES, J. B.; OBRADOVIĆ, A. *Agrobacterium arsenijevicei* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 373-378, 2015.
- KUZMANOVIĆ, N.; PUŁAWSKA, J.; SMALLA, K.; NESME, X. *Agrobacterium rosae* sp. nov., isolated from galls on different agricultural crops. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 191-197, 2018.

- KYNDT, T.; QUISPE, D.; ZHAI, H.; JARRET, R.; GHISLAIN, M.; LIU, Q.; KREUZE, J. F. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 122, n. 18, p. 5844-5849, , 2015.
- 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.
- LE, T. T.; MURUGESAN, K.; NAM, I. H.; JEON, J. R.; CHANG, Y. S. Degradation of dibenzofuran via multiple dioxygenation by a newly isolated *Agrobacterium* sp. PH08. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 542-553, 2014.
- LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; DA SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; DE SOUZA MOREIRA, F. M.; Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, n. 1, p. 127–145, 2009.
- LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 365-367, 1989.
- LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolution and phylogeny of rhizobia. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, n. 1-2, p. 43-60, 2005
- LLOYD, A. T.; SHARP, P. M. Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, v. 37, n. 4, p. 399-407, 1993.
- LU, Y. L.; CHEN, W. F.; HAN, L. L.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 3006-3011, 2009.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 155-173, 1994.
- MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. Á; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSEL, J. E; URWIN, R.; QING, Z.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT D. A.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G.; FEAVERS, I. M. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.
- 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.
- MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D. A.; BOULNOIS G. J.; CLAVERYYS J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 13, p. 3479–3483.1992.

- MATVEEVA, T. V.; BOGOMAZ, D. I.; PAVLOVA, O. A.; NESTER, E. W.; LUTOVA, L. A. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 12, p. 1542-1551, 2012.
- MATTHYSSE, A. G.; YARNALL, H.; BOLES, S. B.; MCMAHAN, S. A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1490, n. 1-2, p. 208-212, 2000.
- MERLO, D. J.; NESTER, E. W. Plasmids in avirulent strains of *Agrobacterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 129, n. 1, p. 76-80, 1977.
- MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. D. S.; SIMÃO A. N., R.; DE SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, 2006.
- MORTON, E. R.; FUQUA, C. Laboratory maintenance of *Agrobacterium*. **Current Protocols in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 3D. 1.1-3D. 1.6, 2012.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 948, 2001.
- 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, n. 2, p. 84-90, 2015.
- NASER, S. M.; DAWYNDT, P.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; VANCANNEYT M., SWINGS, J. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2777-2789, 2007.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 208-216, 2007.
- OTTEN, L.; BURR, T.; SZEGEDI, E. *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In: TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. (Eds). **Agrobacterium: from biology to biotechnology**. New York: Springer, , 2008. p. 1-46.
- PANDAY, D.; SCHUMANN, P.; DAS, S. K. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2632-2639, 2011.
- PAVLOVA, O. A.; MATVEYEVA, T. V.; LUTOVA, L. A. *rol*-genes of *Agrobacterium rhizogenes*. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 4, n. 2, p. 137-145, 2014.
- PILLONEL, T.; BERTELLI, C.; SALAMIN, N.; GREUB, G. Taxogenomics of the order Chlamydiales. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1381-1393, 2015.

PLATT, T. G.; MORTON, E. R.; BARTON, I. S.; BEVER, J. D.; FUQUA, C. Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 635, 2014

POSTGATE, J. R. Biological nitrogen fixation: fundamentals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences**, v. 296, n. 1082, p. 375-385, 1982.

QUISPE-HUAMANQUISPE, D. G.; GHEYSEN, G.; KREUZE, J. F. Horizontal gene transfer contributes to plant evolution: the case of *Agrobacterium* T-DNAs. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2015, 2017.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; FRASCO, L.; LASSALLE, F.; DIEHL, B.; CHAPULLIOT, D.; DAUBIN, V.; NESME, X.; MULLER, D. Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium/Rhizobium* supercluster characterized by the presence of a linear chromid. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 73, p. 202-207, 2014.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 297-306, 2009.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, 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, n. 45, 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**, e1900 v.1, 2016.

SAKAMOTO, M.; OHKUMA, M. Identification and classification of the genus *Bacteroides* by multilocus sequence analysis. **Microbiology**, v. 157, n. 12, p. 3388-3397, 2011.

SANGAL, V.; GOODFELLOW, M.; JONES, A. L.; SCHWALBE, E. C.; BLOM, J.; HOSKISSON, P. A.; SUTCLIFFE, I. C. Next-generation systematics: An innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38392, 2016.

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

SCHLEIFER, K. H. Microbial diversity: facts, problems and prospects. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 3-9, 2004.

SHENG, J.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1699, 1996.

SHI, K.; HUANG, W, M.; AIHARA, H. An enzyme-catalyzed multistep DNA refolding mechanism in hairpin telomere formation. **PLoS Biology**, v. 11, n. 1, p. e1001472, 2013.

SLABBINCK, B.; DE BAETS, B.; DAWYNDT, P.; DE VOS, P. Análisis de *Pseudomonas* fitopatógenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género *Pseudomonas*. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 28, n. 1, p1-16, 2010.

SMIT, S.; WIDMANN, J.; KNIGHT, R. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 10, p. 3339-3354, 2007

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **Nature**, v. 193, n. 4818, p. 855-860, 1962

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.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 70 p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 93).

SUZUKI, K., TANAKA, K., YAMAMOTO, S., KIYOKAWA, K., MORIGUCHI, K., YOSHIDA, K. Ti and Ri plasmids. In: SCHWARTZ, E. (Ed). **Microbial megaplasmids**. Heidelberg, Berlin: Springer, 2009., p. 133-147. (Microbiology Monographs, v. 11)

THOMPSON, C. C.; SILVA G. G. Z.; VIEIRA, N. M.; EDWARDS, R.; VICENTE, A. C. P.; THOMPSON, F. L. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5107-5115, 2005.

THOMPSON, C. C.; VIEIRA, N. M.; VICENTE, A. C. P.; THOMPSON, F. L. Towards a genome based taxonomy of Mycoplasmas. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1798-1804, 2011.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 147-154, 2006.

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: **Microbes for Legume Improvement**. Springer, Cham, 2017. p. 1-43.

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.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (eds.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1997.

WANG, E. T.; VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; SUI, X. H.; DORADO, O.; CHEN, W. X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 687-699, 1998.

WANG, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root-and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPLETT, E. W. (Ed) **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process**. Wymondham-UK: Horizon Scientific Press, 2000. p.177-186, 2000.

WANG, S.; HUANG, H.; XIE, K.; XU, P. Identification of nicotine biotransformation intermediates by *Agrobacterium tumefaciens* strain S33 suggests a novel nicotine degradation pathway. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 6, p. 1567-1578, 2012.

WETZEL, M. E.; KIM, K. S.; MILLER, M.; OLSEN, G. J.; FARRAND, S. K.; Quorum-dependent mannopine-inducible conjugative transfer of an *Agrobacterium* opine-catabolic plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 5, p. 1031-1044, 2014.

WHITE, F. F.; GARFINKEL, D. J.; HUFFMAN, G. A.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. **Nature**, v. 301, n. 5898, p. 348, 1983.

WIESER, M.; HEINZMANN, K.; KIENER, A. Bioconversion of 2-cyanopyrazine to 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid with *Agrobacterium* sp. DSM 6336. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 174-176, 1997.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1-2, p. 3-14, 2006.

WINANS, S. C.; Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 12-31, 1992.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, 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 Sciences 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 Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

YAN, J.; LI, Y.; YAN, H.; CHEN, W. F.; ZHANG, X.; WANG, E. T.; HAN X. Z.; XIE, Z. H. *Agrobacterium salinitolerans* sp. nov., a saline-alkaline-tolerant bacterium isolated from root nodule of *Sesbania cannabina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1906-1911, 2017.

YI, H.; CHUN, J. *Neisseria weaveri* ANDERSEN et al. 1993 is a later heterotypic synonym of *Neisseria weaveri* HOLMES et al. 1993. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 463-464, 2015.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*—a reply to Farrand et al. (2003). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1689-1695, 2003.

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

ZAHRADNÍK, J.; NUNVAR, J.; PAŘÍZKOVÁ, H.; KOLÁŘOVÁ, L.; PALYZOVÁ, A.; MAREŠOVÁ, H.; KYSLÍK, P. *Agrobacterium bohemicum* sp. nov. isolated from poppy seed wastes in central Bohemia. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 184-190, 2018.

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.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

ZHAO, L.; FAN, M.; ZHANG, D.; YANG, R.; ZHANG, F.; XU, L.; WEI X.; SHEN Y.; WEI, G. Distribution and diversity of rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in Northwest China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 449-456, 2014.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of Theoretical Biology**, v. 8, n. 2, p. 357-366, 1965.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. ARTIGO 1

#### **Esboço genômico de *Agrobacterium deltaense* estirpe CNPSo 3391, isolada de um nódulo de soja em Moçambique**

**Resumo:** A estirpe CNPSo 3391 de *Agrobacterium deltaense* foi isolada de um nódulo de soja em Moçambique. Seu genoma foi estimado em 4,926,588 pb e carrega vários genes para tolerância e estresse, mas sem identificação de genes de nodulação e virulência. Possíveis papéis ecológicos de bactérias isolada de nódulo de leguminosas e intimamente relacionados com *Agrobacterium* são discutidos.

**Palavras-chave:** *Rhizobium*, simbiose, nodulação, endófitos, bactérias promotoras do crescimento de plantas.

## **Draft Genome of *Agrobacterium deltaense* strain CNPSo 3391, Isolated from a Soybean Nodule in Mozambique**

Anderson José Scherer,<sup>a,b</sup> Jakeline Renata Marçon Delamuta,<sup>a,c</sup> Renan Augusto Ribeiro,<sup>c</sup> Amaral Machaculeha Chibeba,<sup>d</sup> Stephen Kyei-Boahen,<sup>d</sup> Marco Antonio Nogueira,<sup>a,b,c</sup> Mariangela Hungria<sup>a,b,c,#</sup>

<sup>a</sup>Embrapa Soja, Soil Biotechnology Laboratory, C.P. 231, 86001-970, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>b</sup>Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 10011, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>c</sup>CNPq, SHIS QI 1 Conjunto B, Blocos A, B, C e D, Lago Sul, 71605-001, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>d</sup>International Institute of Tropical Agriculture (IITA), P.O. Box 709, Nampula, Mozambique  
#Corresponding author. E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br

Keywords: *Rhizobium*; Symbiosis; Nodulation; Endophytes; Plant-growth Promoting Bacteria.

***Agrobacterium deltaense* strain CNPSo 3391 was isolated from a soybean nodule in Mozambique. Its genome was estimated at 4,926,588 bp and it carries several coding sequences for stress tolerance, but no identifiable nodulation or virulence genes. Possible ecological roles of bacteria isolated from legume nodules and closely related to *Agrobacterium* are discussed.**

For two decades our group has reported the isolation of agrobacteria from root nodules of soybean (*Glycine max*) (1, 2, 3), common bean (*Phaseolus vulgaris*) (4, 5, 6), and other legumes (7, 8, 9). However, the ability to re-establish nodulation with the host legume is usually not confirmed. Another example is *Agrobacterium deltaense* type strain YIC4121<sup>T</sup>,

isolated from a root nodule of *Sesbania cannabina* in China; the ability to nodulate seven legumes was not confirmed (10). Here we report the draft genome of strain CNPSo 3391 (=Moz59, =9 J1), isolated from a plant grown in Mutequelesse, Gurué District, Zambézia Province, Mozambique showing no symptoms of N-deficiency. Preliminary genetic characterization based on the 16S rRNA and three housekeeping genes positioned the strain in a *Rhizobium-Agrobacterium* clade (3).

Growth conditions for CNPSo 3391 were the same reported for its isolation (3) and DNA extraction and paired-end sequencing on the MiSeq platform (Illumina) performed as described before (11), resulting in 630,975,648 bp. Shotgun sequences were assembled with the A5-MiSeq pipeline (*de novo*) v.20140604 with 128-fold genome coverage assembled in 50 contigs with an N50 of 177,127 bp. The genome was estimated at 4,926,588 bp, with G+C content of 59.9 mol%, confirmed with RAST v.2.0 (12) and QUAST v.2.0 (13), using default parameters. Average Nucleotide Identity (ANI) (ANI calculator, 14) indicated highest similarity (97.68%) with *Agrobacterium deltaense* YIC4121<sup>T</sup>. Compared to the genomes of *A. deltaense* at the NCBI (strains NCPPB 1641, RV3, Zutra 3-1, YIC4121<sup>T</sup>), CNPSo 3391 is slightly smaller than YIC4121<sup>T</sup> (5.02 MB), but within the same C+G range of all strains.

A total of 4,765 DNA coding sequences (CDSs) were identified in RAST (12), with 49% classified in 475 subsystems; this annotation is the public version available at Genbank. Similarly to *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup>, CNPSo 3391 carries no nodulation genes, or *nif* and *fix* operons. However, CNPSo 3391 also carries no genes related to virulence, and we were not able to find sequences coding for *telA*, related to the speciation of some *Agrobacterium* (15). The environmental adaptability of CNPSo 3391 might be explained by genes such as 63 CDSs related to resistance to antibiotic and toxic compounds, 51 to iron acquisition and metabolism, 104 to motility and chemotaxis, and 162 to stress response.

Isolation of agrobacteria from legume root nodules seems to occur worldwide, with reports in Brazil (2, 4, 6, 7, 8, 9), China (10), Ecuador (5), Mozambique (3), Paraguay (1), among other countries. As these bacteria apparently do not carry nodulation genes, Yan et al. (10) suggested that they might be endophytes, but we cannot discard the hypothesis of a temporary acquisition of a symbiotic plasmid from another rhizobia. However, their role in symbiosis deserves further investigation; interestingly, three decades ago *in vivo* results suggested that *Agrobacterium* might produce extracellular “signals” that would supplement the ability of rhizobia to induce root nodulation in the host legume (16).

**Accession number(s).** The whole genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank.: Submission ID (SUB4867670), BioProject (PRJNA507793), BioSample (SAMN10506010), Organism (RRZI00000000), Accession (RRZI00000000); the version described in this paper is RRZI01000000.

## FUNDING INFORMATION

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

## REFERENCES

1. Chen LS, Figueredo A, Pedrosa FO, Hungria M. 2000. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Appl Environ Microbiol* 66:5099-5103. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.5099-5103.2000>.
2. Hungria M, Chueire LMO, Megías M, Lamrabet Y, Probanza A, Guttierrez-Manero FJ, Campo RJ. 2006. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia

- isolated from soybean nodules. *Plant Soil* 288:343-356. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9125-0>.
3. Chibeba AM, Kyei-Boahen S, Guimarães MF, Nogueira MA, Hungria M. 2017. Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agric Ecosyst Environ* 246:291-305. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.017>.
  4. Grange L, Hungria M. 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol Biochem* 36:1389-1398. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.03.005>.
  5. Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Dall'Agnol RF, Graham PH, Martínez-Romero E, Hungria M. 2013. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Res Microbiol* 164:740-748. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.05.002>.
  6. Costa MR, Chibeba AM, Mercante FM, Hungria M. 2018. Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean [*Phaseolus vulgaris* (L.)] isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. *Symbiosis* 76:163-176. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0543-6>.
  7. Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN, Martínez-Romero E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29:315-32. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.002>.
  8. Binde DR, Menna P, Bangel EV, Barcellos FG, Hungria M. 2009. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of fifty-four elite commercial rhizobial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:897-908. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1927-6>.
  9. Roma Neto I, Ribeiro RA, 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* 22:1291-1302. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0300-3>.
  10. Yan J, Li Y, Han XZ, Chen WF, Zou WX, XIE Z, Li M. 2017. *Agrobacterium deltaense* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from nodule of *Sesbania cannabina*. *Arch Microbiol* 199:1003-1009. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1367-0>.
  11. Megías E, Reis Junior FB, Ribeiro RA, Ollero FJ, Megías M, Hungria M. 2017. Genome sequence of *Pantoea ananatis* strain AMG 501, a plant-growth promoting bacterium isolated from rice leaves grown in paddies of southern Spain. *Genome Announc* 5(34):e00848-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00848-17>.
  12. 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>.
  13. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
  14. Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT. 2016. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Prepr* 4:e1900v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>.

15. Ramírez-Bahena MH, Frasco L, Lassalle F, Diel B, Chapulliot D, Daubin V, Nesme X, Muller D. 2014. Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium/Rhizobium* supercluster characterized by the presence of a linear chromid. *Mol Phylogenet Evol* 73: 202-207. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.005>.
16. Caetano-Anollés G, Bauer WD. 1988. Enhanced nodule initiation on alfalfa by wild-type *Rhizobium meliloti* co-inoculated with *nod* gene mutants and other bacteria. *Planta* 174:385-395. <https://doi.org/10.1007/BF00959525>.

## 4.2. ARTIGO 2

### ***Agrobacterium fabaceae* sp. nov., isolada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* a partir de um solo do estado do Mato Grosso do Sul, centro-oeste do Brazil.**

**Resumo:** Membros do gênero *Agrobacterium* são Gram-negativos, Alphaproteobacteria associados com o solo, plantas e conhecidos, principalmente, por seu potencial patogênico para plantas e humanos e amplo uso como ferramenta em biotecnologia. Nós estudamos isolados do estado de Mato Grosso do Sul, no centro-oeste do Brasil, capturados por nódulos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L). A análise das sequências do gene 16S RNAr posicionou a estirpe CNPSo 2736<sup>T</sup> no clado de *Agrobacterium radiobacter* e *A. deltaense*. A análise por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) com três genes *housekeeping* (*atpD*, *glnII* e *recA*) posicionou a CNPSo 2736<sup>T</sup> em um clado distinto de todas as estirpes descritas, mostrando maior similaridade com *A. deltaense*. A identidade de nucleotídeos (*Nucleotide Identity*, NI) dos três genes *housekeeping* concatenados com as espécies mais próximas foi de 96,4% com *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup>. Os valores de Índice de Identidade Nucleotídica (*Average Nucleotide Identity*, ANI) do genoma completo de CNPSo 2736<sup>T</sup> e as duas espécies mais próximas foram de 95,08% com *A. deltaense* e 91,56% com *A. salinitolerans*. A hibridação digital DNA-DNA (*Digital DNA-DNA hybridization*, DDH) com *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup> foi estimada em 63,10%. A capacidade da estirpe de nodular o feijoeiro não foi confirmada, e hipóteses sobre o papel ecológico de *Agrobacterium* na fixação simbiótica do nitrogênio são discutidas. Outras propriedades fenotípicas e genotípicas foram determinadas para o novo clado. Nossos dados dão suporte à descrição da estirpe CNPSo 2736<sup>T</sup> como uma nova espécie, para a qual é

proposto o nome *Agrobacterium fabaceae*. A estirpe tipo é a CNPSo 2736<sup>T</sup> (=LMG 30306<sup>T</sup> =U12000<sup>T</sup> =CPAO 34.4F3<sup>T</sup>).

**Palavras-chave:** *Agrobacterium*; *Rhizobium*; Nodulação; Leguminosas; MLSA; ANI.

***Agrobacterium fabaceae* sp. nov., trapped by nodules of *Phaseolus vulgaris* from a soil of Mato Grosso do Sul State, Midwestern Brazil.**

Anderson José Scherer,<sup>1,2,†</sup> Jakeline Renata Marçon Delamuta,<sup>1,3,†</sup> Renan Augusto Ribeiro,<sup>3</sup> Itamar Soares de Melo,<sup>4</sup> and Mariangela Hungria<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>*Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970, Londrina, Paraná, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 10011, 86057-970 Londrina, Paraná, Brazil;*

<sup>3</sup>*CNPq, SHIS QI 1 Conjunto B, Blocos A, B, C e D, Lago Sul, 71605-001, Brasília, Federal District, Brazil*

<sup>4</sup>*Embrapa Meio Ambiente, C.P. 69, 13820-000, Jaguariúna, São Paulo, Brazil.*

† Both authors contributed equally to this study

\*Corresponding author

**Running title:** *Agrobacterium fabaceae* sp. nov.

Number of text pages	13
Number of Tables	1
Number of Figures	2
Number of Supplementary Tables	1
Number of Supplementary Figures	4

\*Corresponding author:

Mariangela Hungria

Embrapa Soja

Cx. Postal 231

86001-970, Londrina, Paraná, Brazil

Fax: (+55)4333716100

Telephone: (+55)4333716206

E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br; biotecnologia.solo@hotmail.com

E-mail addresses: A.J. Scherer (ander.j.scherer@gmail.com); J.R.M. Delamuta (jake\_renata@hotmail.com); R.A. Ribeiro (renanribeiro83@hotmail.com); I.S. Melo (itamar.melo@embrapa.br); M. Hungria (mariangela.hungria@embrapa.br).

New sequences deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ: *atpD* of CNPSo 2736<sup>T</sup> (MK352280), and *glnII* of *A. larrymoorei* ATCC 51759<sup>T</sup> (MK352281). All other sequences have been deposited before and are available at the GenBank/EMBL/DDBJ

***Agrobacterium fabaceae* sp. nov., trapped by nodules of *Phaseolus vulgaris* from a soil of Mato Grosso do Sul State, Midwestern Brazil.**

**Abstract**

Members of the genus *Agrobacterium* are Gram-negative, Alphaproteobacteria associated with soil, plants and known mainly for their plant and human pathogenicity and their broad use as a biotechnological tool. We studied isolates from soils of Mato Grosso do Sul State, Midwestern Brazil, trapped by nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Sequence analysis of the 16S rRNA gene positioned the strain CNPSo 2736<sup>T</sup> in the clade of *Agrobacterium radiobacter* and *A. deltaense*. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of three housekeeping genes (*atpD*, *glnII* and *recA*) positioned the CNPSo 2736<sup>T</sup> strain in a distinct clade from all described species, showing higher similarity with *A. deltaense*. Nucleotide Identity (NI) of the three concatenated housekeeping genes with the nearest species was of 96.4% with *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup>. The Average Nucleotide Identity (ANI) values of the complete genome of CNPSo 2736<sup>T</sup> and the two closest species were of 95.08% with *A. deltaense* and 91.56% with *A. salinitolerans*. Digital DNA-DNA Hybridization (DDH) with *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup> was estimated at 63.10 %. The capacity to nodulate common bean was not confirmed, and hypotheses for the ecological role of *Agrobacterium* in nitrogen-fixing symbiosis are discussed. Other phenotypic and genotypic characteristics were determined for the new clade. Our data support the description of the CNPSo 2736<sup>T</sup> strain as a new species, for which the name *Agrobacterium fabaceae* is proposed. The strain type is CNPSo 2736<sup>T</sup> (=LMG 30306<sup>T</sup> =U12000<sup>T</sup> =CPAO 34.4F3<sup>T</sup>).

**Keywords:** *Agrobacterium*; *Rhizobium*; nodulation; legumes; MLSA; ANI

---

The name *Agrobacterium* was proposed in 1942 by Conn, and more recently the genus was redefined as a monophyletic group of the family Rhizobiaceae, characterized by a specific nucleus genome architecture consisting of a circular chromosome and a large linear chromosome [1]. In agriculture, *Agrobacterium* is recognized mainly as plant pathogens, but the genus also includes non-pathogenic strains. Pathogenic strains can cause crown gall disease [2] mainly determined by the presence of tumor-inducing plasmid (Ti) in their genomes [3], and strains harboring the root-inducing plasmid (Ri) are the agents of hairy root disease [2, 4]. It has also been reported that *Agrobacterium* strains can carry a symbiotic plasmid (Sym) and form nodules in legumes [5, 6]. However, the main reports of *Agrobacterium* are about their identification as human pathogens maintaining relationships with nosocomial infections [7], and as a biotechnological tool [8], for example in programs for obtaining genetically-modified plants [9].

## **Isolation and Ecology**

For the last two decades our group has reported the isolation of agrobacteria from root nodules of several legumes, with an emphasis on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [10, 11, 12]. The most recent study was performed with strains isolated from nodules of common bean that had received as inoculant soils from several sites of Mato Grosso do Sul State, Midwestern Brazil [12]. We started a polyphasic analysis with two strains from the study of Costa et al. [12], with indications that they might represent a new species, CNPSo 2736<sup>T</sup> (=CPAO 34.4F3<sup>T</sup>) and CNPSo 2707 (=CPAO 33.12F3). As we proceeded with the analyses, we verified that both strains had the same BOX-PCR profile and other similar features; therefore, we proceeded describing the results obtained with strain CNPSo 2736<sup>T</sup>, obtained

from a soil of Laguna Caarapã (22°33'S, 55°09'W, 502 m altitude, Köppen-Geiger climate classification Cfa), Atlantic Forest biome. Both strains are deposited at the “Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja” (WFCC Collection # 1213, WDCC Collection # 1054), Londrina, Paraná State, Brazil, as well as in other culture collections. The strains were grown on modified-yeast extract-mannitol agar (YMA) medium [13], at 28 °C. Stock cultures were maintained on modified-YMA at 4 °C, while long-term preservation was performed in modified-YM with 30% glycerol at –80 °C and –150 °C, or by lyophilization.

## Phylogeny

From now we will present the results obtained with strain CNPSo 2736<sup>T</sup>. A phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene including the species of *Agrobacterium* was performed using maximum likelihood (ML) algorithm [14] with MEGA software version 7 [15]; multiple sequence alignment was constructed with MUSCLE [16] and the model used was the Tamura 3-parameter [17], with gamma-distributed invariant sites (G+I). Tree node support was evaluated with bootstrap analysis [18] using 1,000 pseudoreplicates. Fig. 1 shows the results obtained when the analysis was performed with the most representative species, and accession numbers are shown in the tree. The 16S rRNA phylogenetic tree indicated highest similarity of the strain with *A. deltaense* and *A. radiobacter* (Fig. 1), but clearly highlighted that other housekeeping genes would be necessary to the proper identification of the species, as suggested in other studies [19, 20].

Three housekeeping genes were analyzed, *atpD*, *glnII* and *recA*, using the same parameters as defined for the 16S rRNA gene; however, the model selected was the Tamura-Nei [21] with gamma distribution (G) for the MLSA analysis. The accession numbers are indicated in the trees obtained for each gene, shown in Figs. S1 to S3, respectively. When the genes were

analyzed individually, CNPSo 2736<sup>T</sup> phylogeny showed congruence between them and with the 16S rRNA. It is important to emphasize that *recA* (Fig. S3) is an important gene for the taxonomy of *Agrobacterium* [22]. When the concatenated genes were considered for the MLSA analysis, CNPSo 2736<sup>T</sup> was clearly distinct from all described species, with *A. deltaense* representing the closest taxon (Fig. 2).

Nucleotide Identities (NI) of the 16S rRNA and housekeeping genes were calculated with BioEdit [23] and are shown in Table 1. The similarity of the 16S rRNA between CNPSo 2736<sup>T</sup> with the closest species of the MLSA analysis, *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup>, was of 100 %. For the three housekeeping genes, the similarities ranged from 94.4 to 97.7 % with *A. deltaense*, and for the concatenated housekeeping genes was of 96.4 %, values that indicate a new clade.

## Genome Features

Values of Average Nucleotide Identity (ANI) of the whole genomes between 95 % and 96 % are equivalent to the 70 % DNA-DNA hybridization (DDH) threshold [24, 25, 26], being important for describing new species [e.g. 27, 28]. Total DNA of CNPSo 2736<sup>T</sup> was used to build the library using the Nextera XT kit, according to manufacturer's instructions. The library was processed on the MiSeq platform (Illumina) at Embrapa Soja. Shotgun sequences were assembled with the A5-MiSeq pipeline (*de novo*) v.20140604 and allowed 146-fold genome coverage assembled in 50 contigs, with N50 of 312,505. The genome was estimated at 5,567,602 bp, confirmed with RAST v.2.0 [29] and QUAST v.2.0 [30]. The genome of *A. fabaceae* strain CNPSo 2736<sup>T</sup> was deposited at the NCBI and received the Accession Number RZTX00000000. ANI values were obtained using ANI calculator [31]. Genome sequences of the closest type strains of *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup>, *A. salinitolerans* YIC5082<sup>T</sup>, *A. pusense* NRCPB10<sup>T</sup> and *A. radiobacter* LMG 140<sup>T</sup> were retrieved from GenBank (MRDI00000000,

MRDH00000000, MRDJ00000000, MRDG00000000, respectively) and ANI values between CNPSo 2736<sup>T</sup> and these species were of 95.08 %, 91.56 %, 87.86 % and 90.87 %, respectively, another evidence that our strain represents a new species. It is important to comment that, as suggested by Goris et al. [26], higher resolution should be adopted for particular groups of organism; certainly, *Agrobacterium* is one of these groups where ANI values above 96% had to be considered to differentiate species.

We have also estimated the digital DNA-DNA hybridization, which is a bioinformatics method that allows comparisons *in silico* [32, 33]. All pairwise value with the closest species *A. deltaense* YIC4121<sup>T</sup> was estimated by GGDC v2.1 using the recommended 'Formula 2' (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>). The DNA-DNA Hybridization (DDH) value of 70 % threshold has been used as the gold standard for species definition [24, 25, 26, 34], and we found the value of 63.10 % with the closest species *A. deltaense*, once again highlighting that CNPSo 2736<sup>T</sup> should represent a new species.

The G+C content of the genome of CNPSo 2736<sup>T</sup> was calculated with QUASt [30] as 59.85%, in the same range of the closest species *A. deltaense* (59.8 mol%), *A. salinitolerans* (59.31 mol%) and *A. pusense* (59.24 mol%).

The BOX-PCR methodology using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) algorithm [35] and the Jaccard coefficient [36], considering 2 % of tolerance, and performed with the Bionumerics program (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6) was employed to evaluate the genetic profiles, as described by before [12]. The CNPSo 2736<sup>T</sup> strain differed from the *A. pusense* and *A. radiobacter* type strains used as comparison (Fig. S4).

## Physiology and Chemotaxonomy

The fatty-acid profile of strain CNPSo 2736<sup>T</sup> was determined as described before [37], using the MIDI Sherlock microbial identification system with the TSBA6 database, after growth for three days on YMA. Strain CNPSo 2736<sup>T</sup> presented as major fatty acids summed feature 8 (C<sub>18:1</sub>ω6c/C<sub>18:1</sub>ω7c, 68.89 %); in smaller proportions are found C<sub>16:0</sub> (12.77 %), C<sub>19:0</sub> cyclo ω8c (8.53 %) and summed feature 2 (C<sub>12:0</sub> aldehyde/unknown 10.928/C<sub>14:0</sub> 3-OH/C<sub>16:1</sub> iso I, 9.81 %). The results are in agreement with those reported for the genus *Agrobacterium* [38, 39].

Tests of nodulation in common bean and siratro (*Macropodium atropurpureum*) under greenhouse conditions did not confirm the ability of strain CNPSo 2736<sup>T</sup> to nodulate these legumes. We were also not able to identify nodulation and nitrogen fixation operons in the genome of CNPSo 2736<sup>T</sup>. Isolation of rhizobia resembling agrobacteria from legume root nodules has been reported worldwide, e.g. in Brazil [12], China [39], Ecuador [11], Mozambique [40], and Paraguay [41]. It has been suggested that they might be endophytes in legume nodules [39]; in addition, it has been suggested that *Agrobacterium* might be responsible for the production of extracellular “signals” that would supplement the ability of rhizobia to induce root nodulation in the host legume [42]. Another possibility is that the nitrogen-fixing property was temporarily obtained from a rhizobium symbiotic plasmid, or that the bacterium has a plasmid that it is often lost. We may conclude that the genetics and the contribution of these bacteria to the rhizobium-legume symbiosis remains to be determined.

Tolerance of antibiotics was evaluated using the disc-diffusion method on YMA plates with the following antibiotics (per disc): ampicillin (10 μg), bacitracin (0.04 U), cefuroxime (30 μg), chloramphenicol (30 μg), erythromycin (15 μg), nalidixic acid (30 μg), neomycin (30

µg), penicillin (10 U), streptomycin (10 µg), and tetracycline (30 µg). All tests were performed in triplicate. The CNPSo 2736<sup>T</sup> strain was sensitive to ampicillin, bacitracin, erythromycin, nalidixic acid, neomycin, penicillin and tetracycline, and was resistant or moderately resistant to the other antibiotics.

The phenotypic and physiological features of the novel isolate were determined and compared with close type strains. However, we would like to mention that, as pointed out before [44] these properties are not as important as the genomic features; often the genes coding for these properties are encoded in plasmids that can be easily lost or transferred. Unless indicated, phenotypic tests were performed at 28 °C, evaluating colony morphology, tolerance of NaCl, acid/alkali reaction in YMA medium with bromothymol blue, tolerance of different temperatures and pHs, and growth in liquid Luria-Bertani (LB) medium, as previously described by Hungria et al. [44]. Enzymatic degradation of urea was determined in YMA medium containing 2 % urea and phenol red as indicator. The strain was able to grow under acid (pH 4.0) and basic (pH 9.0) conditions, high temperature (37 °C) and was tolerant of 1% of NaCl. Utilization of different carbon sources was determined using the API 50CH kit (BioMérieux), following the manufacturer's recommendations, using modified-YM-minus-mannitol as the basal medium. All tests were performed in triplicate, and the substrates utilization were scored as no utilization (-), weak utilization (w) and good utilization (+) (Table S1).

Based on the polyphasic analyzes, compiling all phylogenetic, genetic and phenotypic data presented in our study we indicate the strain CNPSo 2736<sup>T</sup> as a new specie of the genus *Agrobacterium*, for which the name *Agrobacterium fabaceae* sp. nov. is proposed.

## Description of *Agrobacterium fabaceae* sp. nov.

*Agrobacterium fabaceae* [fa.ba.ce.ae pl. fem. n. Referring to the isolation from nodules of plants of the Fabaceae family].

Cells are Gram-stain negative, aerobic. Colonies are circular, translucent, with low mucus production, with < 1 mm in diameter when grown in modified-YMA medium containing Congo red after with 2-3 days of incubation at 28 °C. It produces acid reaction in YMA with bromothymol blue. Strain grows on LB medium, at 37 °C, in pH 4.0 and pH 9.0 or with 1 % NaCl and is positive for urease activity. The strain shows intrinsic resistance to the antibiotics chloramphenicol (30 µg) and streptomycin (10 µg), moderately resistant to cefuroxime (30 µg) and sensitive to bacitracin (0.04 U), penicillin (10 U), nalidixic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), erythromycin (15 µg), tetracycline (30 µg), and neomycin (30 µg). In the API test, the strain was positive for glycerol; D-arabinose; L-arabinose; D-ribose, D-xylose, D-adonitol; methyl-β-D-xylopyranoside; L-sorbose; L-rhamnose; amygdalin; esculin ferric citrate; starch; glycogen; D-lyxose; D-tagatose; D-fucose; L-fucose, weakly positive for erythritol; L-xylose; D-galactose; D-glucose; D-fructose; D-mannose, dulcitol; inositol; D-mannitol; D-sorbitol; methyl-α-D-glucopyranoside; arbutin; salicin; D-cellobiose; D-maltose; D-lactose; D-melibiose; D-saccharose; D-trehalose; inulin; D-melezitose; D-raffinose; xylitol; gentiobiose; D-turanose; D-arabitol and L-arabitol and do not use methyl-α-D-mannopyranoside; N-acetylglucosamine; potassium gluconate; potassium 2-ketogluconate and potassium 5-ketogluconate.

The type strain is CNPSo 2736<sup>T</sup> (=LMG 30306<sup>T</sup> =U12000<sup>T</sup> =CPAO 34.4F3<sup>T</sup>) isolated from a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodule of a plant inoculated with a soil of Mato Grosso do Sul, Brazil. The DNA G+C content of the type strain is 59.85 mol%.

The following new sequences have been deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ: *atpD* of CNPSo 2736<sup>T</sup> (MK352280), and *glnII* of *A. larrymoorei* ATCC 51759<sup>T</sup> (MK352281). All other sequences have been deposited before and are available at the GenBank/EMBL/DDBJ

Genome sequence of *Agrobacterium fabaceae* CNPSo 2736<sup>T</sup> (RZTX00000000).

## **Funding**

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

## **Acknowledgements**

To 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.

## **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

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

## **References**

- 1. Ramírez-Bahena MH, Frasco L, Lassalle F, Diel B, Chapulliot D, Daubin V, Nesme X, Muller D.** Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium/Rhizobium* supercluster characterized by the presence of a linear chromid. *Mol Phylogenet Evol* 2014; 73:202-207.
- 2. Escobar MA, Dandekar AM.** *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci* 2003; 8:380-386.

3. **Suzuki K, Tanaka K, Yamamoto S, Kiyokawa K, Moriguchi K, Yoshida K.** Ti and Ri plasmids. In: Schwartz E (editor). *Microbial megaplasmids*. Springer: Berlin, Heidelberg; 2009. pp. 133-147.
4. **Otten L, Burr T, Szegedi E.** *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In: Tzfira T, Citovsky V (eds). *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Springer: New York, NY; 2008. pp. 1-46.
5. **Platt TG, Morton ER, Barton IS, Bever JD, Fuqua C.** Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids. *Front Plant Sci* 2014; 5:635.
6. **Zhao L, Fan M, Zhang D, Yang R, Zhang F, Xu L, Wei X, Shen Y, Wei G.** Distribution and diversity of rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in Northwest China. *Syst Appl Microbiol* 2014; 37:449-456.
7. **Aujoulat F, Jumas-bilak E, Masnou, A et al.** Multilocus sequence-based analysis delineates a clonal population of *Agrobacterium (Rhizobium) radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)* of human origin. *J Bacteriol* 2011; 193:2608-2618.
8. **Le TT, Murugesan K, Nam IH, Jeon JR, Chang YS.** Degradation of dibenzofuran via multiple dioxygenation by a newly isolated *Agrobacterium* sp. PH-08. *J Appl Microbiol* 2014; 116:542-553.
9. **Tzfira T, Citovsky V.** *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17:147-154.
10. **Grange L, Hungria M.** Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol Biochem* 2004; 36:1389-1398.
11. **Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Dall'Agnol RF, Graham PH, Martínez-Romero E, Hungria M.** 2013. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Res Microbiol* 2013; 164:740-748.
12. **Costa MR, Chibeba AM, Mercante FM, Hungria, M.** Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean [*Phaseolus vulgaris* (L.)] isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. *Symbiosis* 2018; 76:163-176.
13. **Hungria M, O'Hara GW, Zilli JE, Araujo RS, Deaker R, Howieson JG.** Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson JG, Dilworth JG (editors). *Working with Rhizobia* ACIAR: Canberra, Australia; 2016. pp. 39-60.
14. **Felsenstein J.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981; 17:368-376.
15. **Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33:1870-1879.
16. **Edgar RC.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:1792-1797.
17. **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.

18. **Felsenstein J.** Confidence-limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39:783-791.
19. **Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J.** Identification of *lactobacilli* by pheS and rpoA gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57:2777-2789.
20. **Debouck DG, Toro O, Paredes M, Johnson WC, Gepts P.** Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. *Econ Bot* 1993; 47:408-423.
21. **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.
22. **Gan HM, Savka MA.** One more decade of *Agrobacterium* taxonomy. In: Gelvin S (editor). *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Cham; 2018. pp. 1-14.
23. **Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.
24. **Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM.** Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:7286- 7293.
25. **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.
26. **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.
27. **Kuzmanović N, Pulawska J, Prokić A, Ivanović M, Zlatković N, Jones JB, Obradović A.** *Agrobacterium arsenijevicei* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. *Syst Appl Microbiol* 2015; 38: 373-378.
28. **Ribeiro RA, Martins TB, Ormeño-Orrillo E, Delamuta JRM, Rogel MA et al.** *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65:3162- 3169.
29. **Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA et al.** *The RAST server: rapid annotations using subsystems technology*. *BMC Genomics* 2008; 9:75.
30. **Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G.** QUASt: quality assessment tool for genome assemblies, *Bioinformatics* 2013; 29:1072-1075.
31. **Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT.** The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Prepr* 2016; 4:e1900v1.

32. **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.
33. **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.
34. **Rosselló-Móra R, Urdiain M, López-López A.** DNA-DNA Hybridization. *Method Microbiol* 2011; 38:325-347.
35. **Sneath PHA, Sokal RR.** Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, USA: W. H. Freeman and Company; 1973. 573 p.
36. **Jaccard P.** The distribution of flora in the alpine zone. *New Phytol* 1912; 11: 37- 50.
37. **Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M.** 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.
38. **Tighe SW, de Lajudie P, Dipietro K, Lindström K, Nick G, Jarvis BDW.** 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.
39. **Yan J, Li Y, Han XZ, Chen WF, Zou WX, XIE Z, Li M.** *Agrobacterium deltaense* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from nodule of *Sesbania cannabina*. *Arch Microbiol* 2017; 199:1003-1009.
40. **Chibeba AM, Kyei-Boahen S, Guimarães MF, Nogueira MA, Hungria M.** Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agric Ecosyst Environ* 2017; 246:291-305.
41. **Chen LS, Figueredo A, Pedrosa FO, Hungria M.** Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:5099-5103.
42. **Caetano-Anollés G, Bauer WD.** Enhanced nodule initiation on alfalfa by wild-type *Rhizobium meliloti* co-inoculated with *nod* gene mutants and other bacteria. *Planta* 1988; 174:385-395.
43. **Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E.** Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis. *Syst Appl Microbiol* 2013; 36:145–147.
44. **Hungria M, Chueire LMO, Coca RG, Megías M.** Preliminary characterization of fast growing strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol Biochem* 2001; 33:1349- 1361.

## Figure Legends

**Figure 1.** Maximum likelihood phylogeny based on the 16S rRNA gene sequences (1,276 bp) of *Agrobacterium* species. Accession numbers are indicated in parentheses. The novel species is shown in bold. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

**Figure 2.** Maximum likelihood phylogeny based on the concatenated gene sequences of *atpD* (323 bp), *glnII* (438 bp) and *recA* (268 bp) genes, showing the relationships between the novel species (in bold) and other members of the *Agrobacterium* genus. Accession numbers are indicated in parentheses. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

**Table 1.** Nucleotide Identity (NI) between *Agrobacterium fabaceae* CNPSo 2736<sup>T</sup> and type strains of related *Agrobacterium* species based on the sequences of the 16S rRNA, and of single genes and concatenated housekeeping genes (*atpD*+*glnII*+*recA*). NA not available

	16S rRNA	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	<i>recA</i>	MLSA
<b>Between <i>A. fabaceae</i> and:</b>					
<i>A. deltaense</i> YIC4121 <sup>T</sup>	100	96.4	97.7	94.4	96.4
<i>A. pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup>	99.3	96.4	95.4	90.6	94.4
<i>A. radiobacter</i> LMG 140 <sup>T</sup>	99.6	95.1	94.7	93.2	94.4
<i>A. fabrum</i> J-07 <sup>T</sup>	98.6	93.5	94.2	89.5	92.8
<i>A. skierniewicense</i> Ch11 <sup>T</sup>	98.5	87.1	94.7	93.2	92
<i>A. rubi</i> HAMBI 1812 <sup>T</sup>	98.5	89.7	89.7	84.7	88.3
<i>A. salinitolerans</i> YIC5082 <sup>T</sup>	99.3	93.8	96.1	92.1	94.3
<i>A. rosae</i> NCPPB 1650 <sup>T</sup>	98.5	86.8	NA	86.1	NA
<i>A. arsenijevicei</i> KFB 330 <sup>T</sup>	98.9	NA	95.2	89.1	NA
<i>A. larrymoorei</i> ATCC 51759 <sup>T</sup>	98.7	NA	85.8	88.4	NA
<i>A. nepotum</i> 39/7 <sup>T</sup>	98.8	NA	NA	89.5	NA

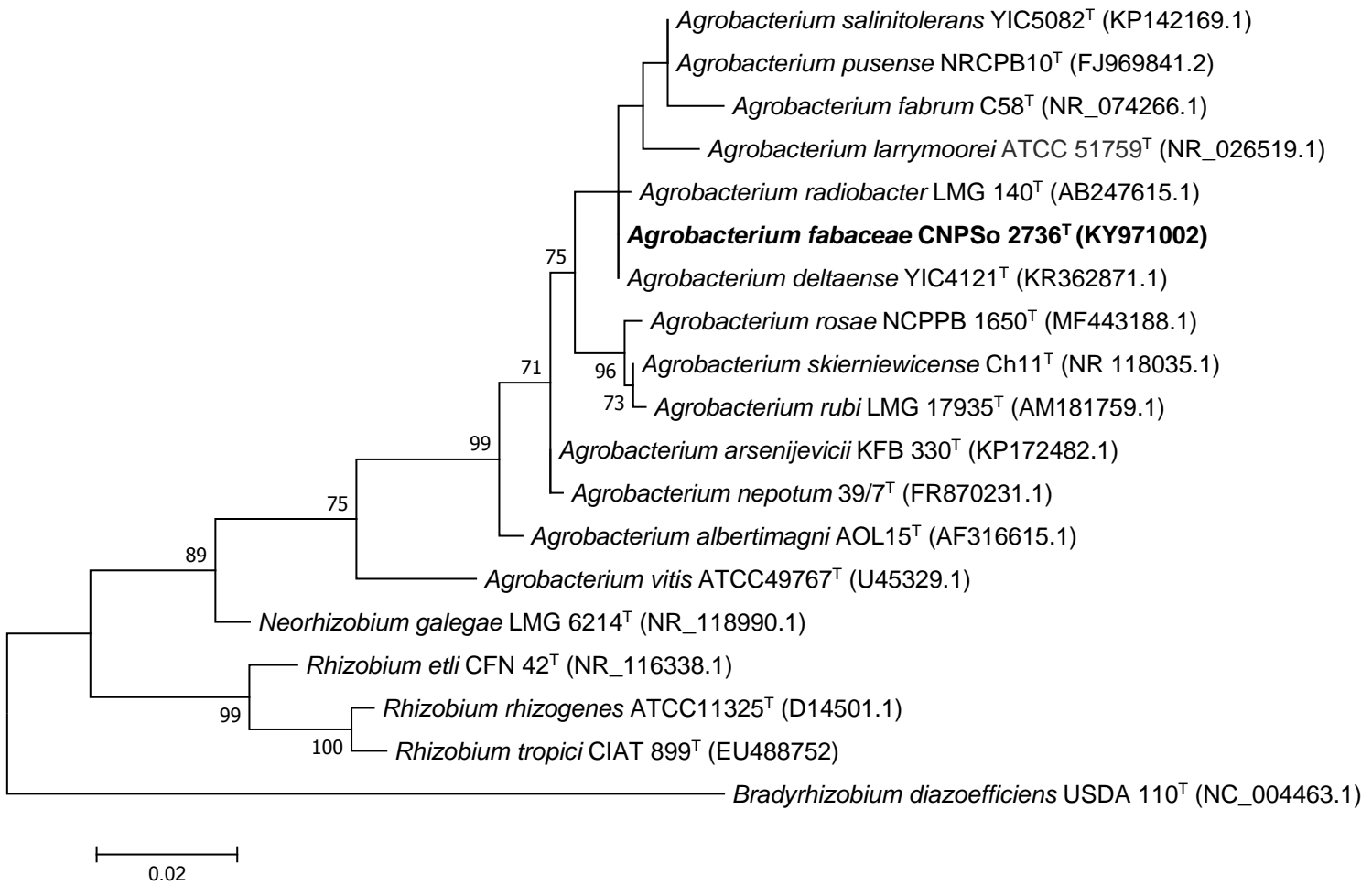


FIG. 01



**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

***Agrobacterium fabaceae* sp. nov., trapped by nodules of *Phaseolus vulgaris*  
from a soil of Mato Grosso do Sul State, Midwestern Brazil.**

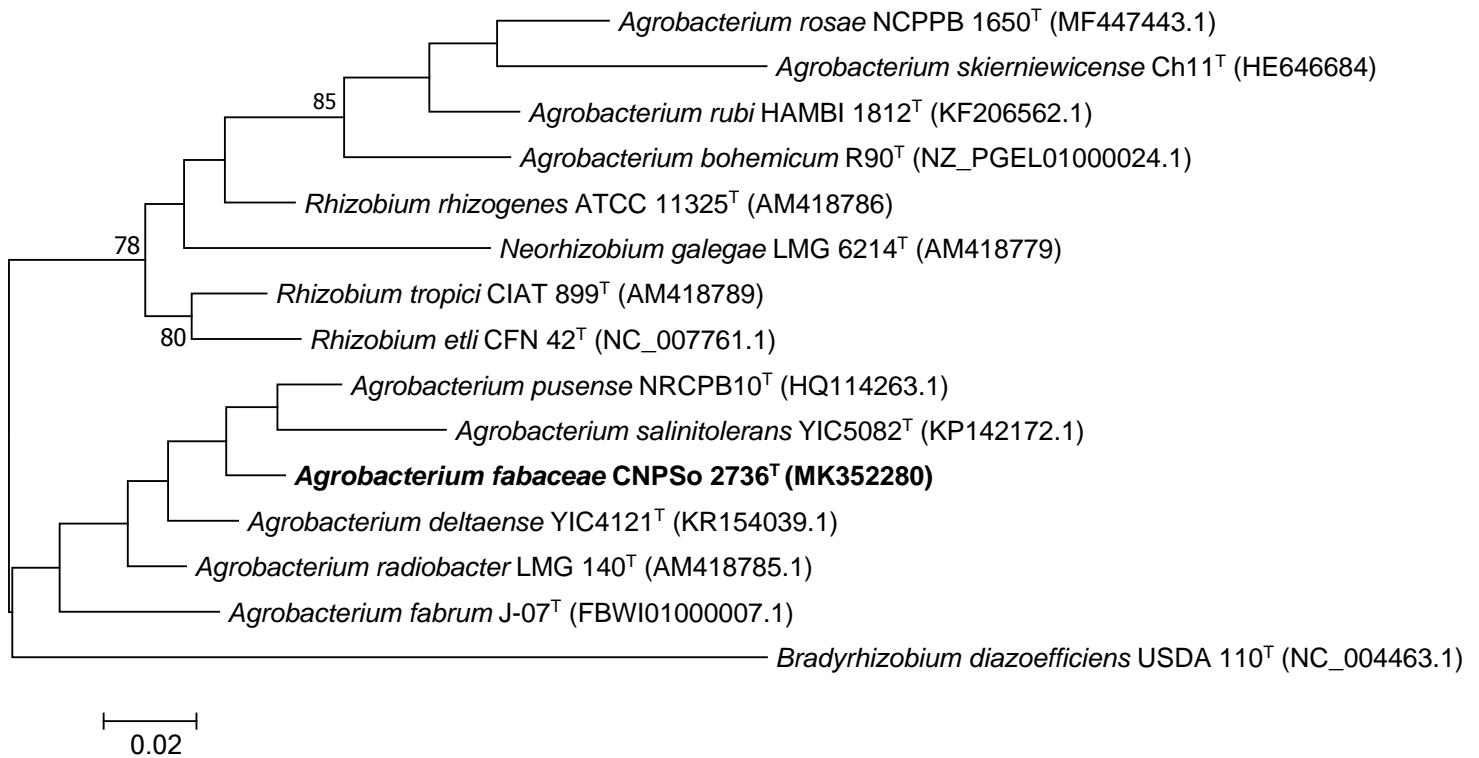
Anderson José Scherer, Jakeline Renata Marçon Delamuta, Renan Augusto Ribeiro, Itamar Soares de Melo, and Mariangela Hungria

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

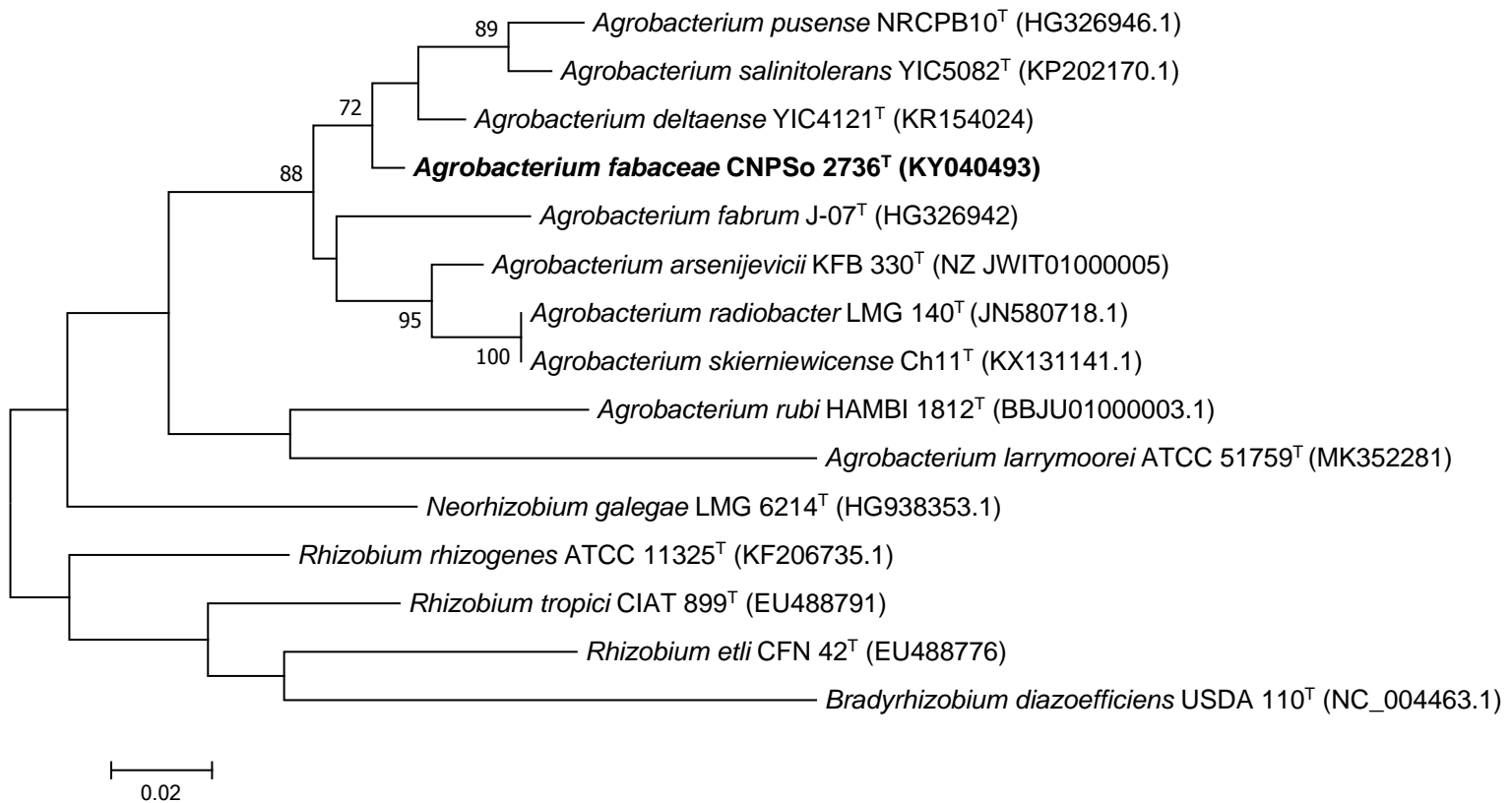
**Table S1.** Distinctive morpho-physiological features of *Agrobacterium fabaceae* and related species. 1. *A. fabaceae* CNPSo 2736<sup>T</sup>, 2. *A. pusense* NRCPB10<sup>T</sup>, 3. *A. radiobacter* LMG 140<sup>T</sup>. Data represent the means of three biological replicates. + growth; - no growth; w weakly positive.

<b>Characteristic</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Carbon source utilization*</b>			
Glycerol	+	w	+
Erythritol	w	-	-
D-ribose	+	w	+
D-xylose	+	w	+
D-glucose	w	w	+
D-fructose	w	w	+
D-mannose	w	w	+
L-sorbose	+	-	-
L-rhamnose	+	w	w
Inulin	w	-	-
D-melezitose	w	-	-
Gentiobiose	w	w	+
D-turanose	w	w	+
D-lyxose	+	w	w
D-tagatose	+	w	w
L-arabitol	w	+	w
Potassium gluconate	-	+	-
<b>Growth at:</b>			
37 °C	+	+	-
<b>Resistance to (µg per disc):</b>			
Cefuroxime (30 µg)	w	-	-
Erythromycin (15 µg)	-	+	+
Nalidixic acid (30 µg)	-	-	w
Penicillin (10 U)	-	+	-
Streptomycin (10 µg)	+	w	+

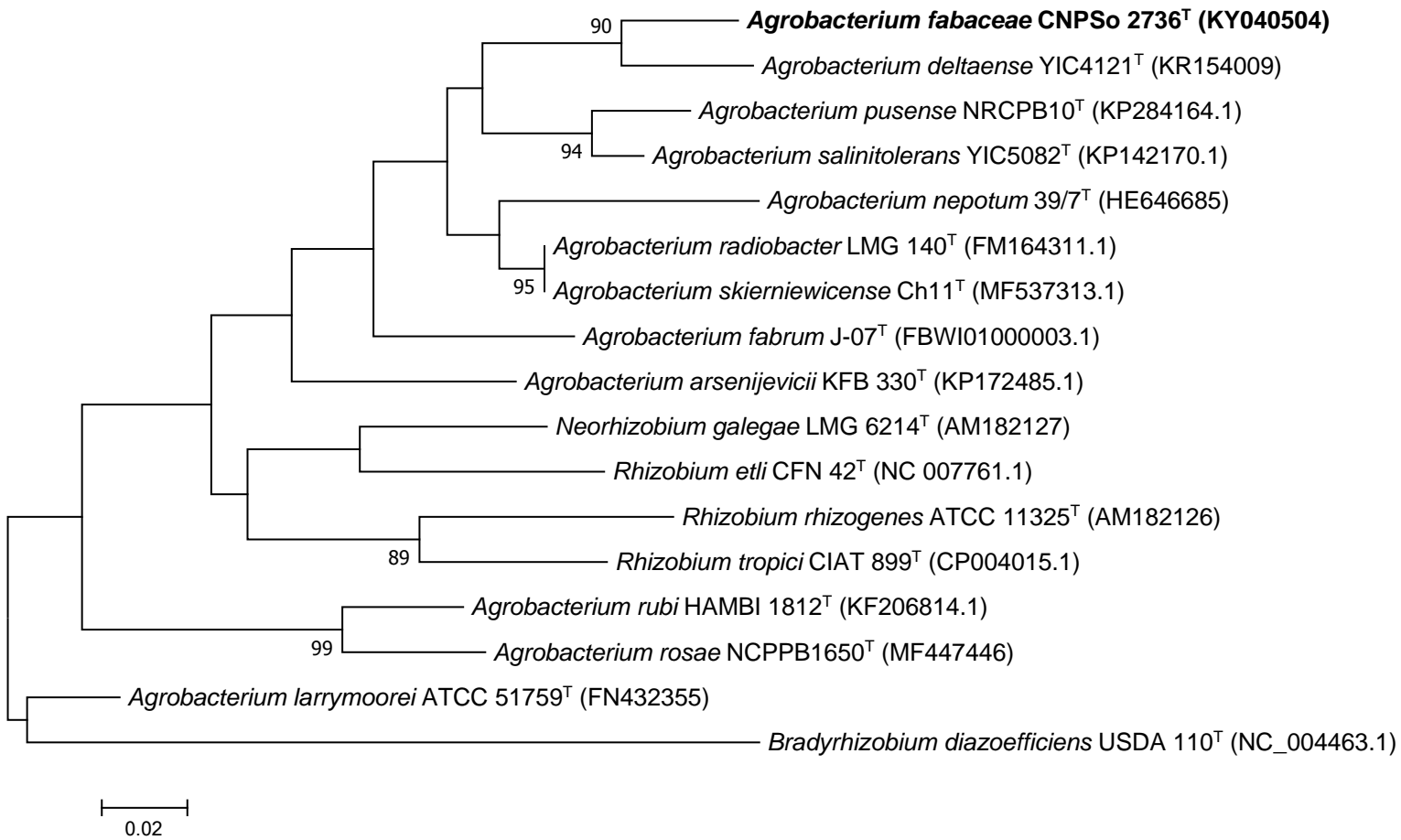
\* Carbon source utilization was evaluated with the API 50CH kit (bioMérieux)



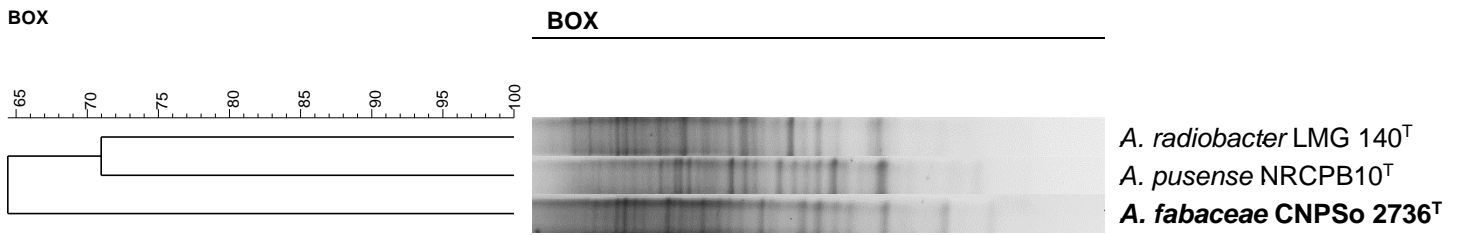
**Fig. S1.** Maximum likelihood phylogram based on *atpD* gene sequences (323 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>r</sup> was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.



**Fig. S2.** Maximum likelihood phylogram based on *glnII* gene sequences (438 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions



**Fig. S3.** Maximum likelihood phylogram based on *recA* gene sequences (268 bp). Accession numbers are indicated in parentheses. Bootstrap support values of 70 % or greater are indicated at the nodes. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.



**Fig. S4.** Cluster analysis of products obtained by BOX- PCR of *Agrobacterium fabaceae* CNPSo 2736<sup>T</sup> and type strains of *Agrobacterium pusense* and *Agrobacterium radiobacter*. Analysis performed with the program Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6) using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) and the Jaccard coefficient, with 2 % tolerance.

## 5. CONCLUSÃO

Os estudos polifásicos foram conclusivos para a avaliação da posição taxonômica das estirpes em estudo. A estirpe CNPSo 3391, isolada de um nódulo de soja na província Zambézia, em Moçambique foi classificada como *Agrobacterium deltaense*, enquanto que para a estirpe CNPSo 2736<sup>T</sup>, isolada de nódulo de feijoeiro inoculado com um solo do Mato Grosso do Sul, houve a indicação de que deve representar uma nova espécie, para a qual foi sugerido o nome de *Agrobacterium fabaceae*.