



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MILENA SERENATO KLEPA

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE *Chamaecrista fasciculata* E DESCRIÇÃO DA NOVA ESPÉCIE *Bradyrhizobium niftali***

---

Londrina  
2019

MILENA SERENATO KLEPA

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE *Chamaecrista fasciculata* E DESCRIÇÃO DA NOVA ESPÉCIE *Bradyrhizobium niftali***

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

M642 Klepa, Milena .  
Taxonomia Polifásica de isolados de Chamaecrista fasciculata e descrição da nova espécie Bradyrhizobium niftali / Milena Klepa. - Londrina, 2019.  
99 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.  
Coorientador: Jakeline Renata Marçon Delamuta.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.  
Inclui bibliografia.

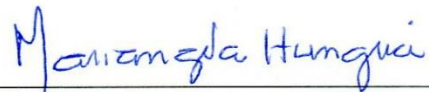
1. Taxonomia polifásica - Tese. 2. Bradyrhizobium - Tese. 3. Nodulação - Tese. 4. Leguminosas - Tese. I. Hungria, Mariangela. II. Marçon Delamuta, Jakeline Renata. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

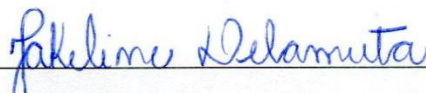
MILENA SERENATO KLEPA

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE *Chamaecrista fasciculata* E DESCRIÇÃO DA NOVA ESPÉCIE *Bradyrhizobium niftali***

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



Orientadora: Dra. Mariângela Hungria  
Embrapa Soja



Dr. Jakeline Renata Marçon Delamuta  
Embrapa Soja



Dr. Manuel Megías Guijo  
Universidade de Sevilla

Londrina, 21 de Outubro de 2019.

*Este trabalho é dedicado à minha amada mãe,  
meu maior exemplo de trabalho e aplicação,  
quem eu considero minha fonte de inspiração  
diária para perseverar.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença inconfundível na forma de claros sinais que me trouxeram força, esperança e mansidão.

À minha orientadora, Dra. Mariangela Hungria, por me confiar a realização deste trabalho e por me facilitar o acesso a esta pesquisa tão enriquecedora para minha carreira. Obrigada pela vasta experiência transmitida por meio de sugestões, críticas construtivas, conselhos e desafios. A você, minha imensa gratidão e admiração.

À minha coorientadora, Dra. Jakeline Renata Marçon Delamuta, por toda paciência e competência demonstrada ao atender minhas dúvidas, me mostrando infinitas possibilidades de trabalho e escrita. Gratidão pelo convívio diário e pelos conselhos concedidos nos momentos incerteza. Desejo demonstrar também minha gratidão ao Dr. Renan Augusto Ribeiro, por pacientemente e generosamente me auxiliar em todas as fases desta pesquisa, mas sobretudo, por todos os momentos de descontração, tornando a rotina de trabalho mais leve.

À minha querida e primeira orientadora da vida, Dra. Jesiane Stefania Batista da Silva, que me apresentou o apaixonante mundo da fixação biológica de nitrogênio e desde meu segundo ano de graduação me apoia e acredita em mim. Gratidão eterna pela indicação e por me abrir tantas e tantas portas.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, por todos os conhecimentos fundamentais em minha formação como microbiologista. Especialmente, quero demonstrar minha gratidão ao Dr. Marco Antonio Nogueira, um grande exemplo de professor e pesquisador na área de microbiologia agrícola.

A todos amigos e funcionários do laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa Soja: Fernanda, Vanessa, Débora, Leandro, Amanda, Camila, Thiago, Anderson, Flávia, Artur, Paula, Marcos Vinícius, Lully, Mariana, Alisson, Rafaela, Paloma, Gabriel, Lígia, Eduara, Rinaldo e Dona Rosa, a minha gratidão por direta ou indiretamente auxiliarem na execução desta pesquisa e carinho por todos os momentos vividos. Em especial, agradeço minha dupla dinâmica e amiga, Maria Clara. Compartilhamos momentos de correria, tensão profissional e pessoal, mas principalmente, de muita parceria e cooperação, resultando em dois trabalhos incríveis e uma linda amizade. Gratidão por este intenso um ano e meio de muito trabalho. Também agradeço especialmente amiga de longa data, Fabiane. Tenho muito orgulho por fazermos parte da jornada científica uma da outra, desde o laboratório de

Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa até atualmente. Gratidão eterna por todo afeto, auxílio e compreensão durante a realização desta pesquisa. Você é minha “irmã científica” para sempre!!!

À minha mãe, Jussani, a quem sou intensamente ligada. Obrigada pelo seu esforço incansável, por exceder tantos limites por mim, por compreender tantas ausências, mas principalmente, obrigada por me ensinar e praticar esse seu amor incondicional que foi essencial nesta importante etapa da minha vida. Agradeço também, ao meu pai, Gilberto e aos meus irmãos, Leonardo e Emily. Gratidão por todo apoio, colaboração e amizade, eu amo muito vocês.

Aos meus avós Erna, Vitoldo, Angelo e Anita (*in memoriam*), por todos valores passados que eu levarei por toda minha vida.

À minha família londrinense, que em nenhum momento deixaram com que eu me sentisse sozinha ou desamparada. Obrigada tia Celita, tia Bernadete, primos Lucas, Pedro e Mariana, eu amo vocês e jamais esquecerei tudo que fizeram por mim. Também agradeço aos demais familiares, que mesmo distantes fisicamente, tenho certeza que torceram por mim, seja por meio de orações ou energias positivas.

Aos amigos que a Biologia me concedeu. Ana Paolla, Brenda e Bruna, é muito recompensador poder contar com vocês e compartilhar momentos alegres e nem tão alegres assim, vocês são verdadeiros presentes em minha vida. À minha veterana preferida, Jordana, que mesmo distante se fez tão presente em vários momentos deste mestrado. Gratidão pelos momentos de terapia via Whatsapp, raros e felizes encontros presenciais e por vibrar tão autenticamente com minhas vitórias. Aos meus colegas de turma, Caroline e Erick, “irmãos Rosso” do meu coração, obrigada por tantas risadas e por tantos sonhos compartilhados.

À banca examinadora, Manolo e Jake, por terem aceitado o convite e por todas as contribuições nesta pesquisa.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A Embrapa Soja, pela estrutura concedida.

**Gratidão eterna!**

*“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but the one most responsive to change.”*

**Charles Darwin**

KLEPA, Milena Serenato. **Taxonomia polifásica de isolados de *Chamaecrista fasciculata* e descrição da nova espécie *Bradyrhizobium niftali***. 2019. 99 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

O crescimento e desenvolvimento vegetal estão intimamente relacionados com a disponibilidade de certos nutrientes no solo. O nitrogênio é necessário devido à sua participação vital em processos biológicos estruturais, metabólicos e genéticos. A principal via de incorporação de nitrogênio à biosfera se dá através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), um processo dependente da redução enzimática do N<sub>2</sub> atmosférico em formas assimiláveis para espécies vegetais. A habilidade de fixar N<sub>2</sub> é restrita a um grupo restrito de bactérias, dentre as quais, os rizóbios se destacam por estabelecerem relações simbióticas com plantas da família Fabaceae, através de estruturas especializadas, denominadas nódulos. Recentemente, um estudo filogenético sugeriu que a tradicional família Fabaceae fosse reclassificada em seis subfamílias, nas quais apenas Papilionoideae e Caesalpinioideae apresentam espécies com habilidade nodulífera. Até o presente momento, o gênero *Bradyrhizobium* tem sido relatado como o principal microssimbionte isolado de Caesalpinioideae, no entanto, a diversidade de rizóbios isolados dessa subfamília ainda é pouco conhecida. Com base em uma abordagem polifásica e visando a descrição de uma nova espécie bacteriana, o presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade de rizóbios isolados de nódulos de *Chamaecrista fasciculata*, uma leguminosa caesalpinioideae nativa da região leste, centro-oeste e sul dos Estados Unidos. Na filogenia do gene ribossomal 16S RNAr, as três estirpes CNPSO 3394, CNPSO 3442 e CNPSO 3448, foram agrupadas no superclado *B. japonicum* e compartilharam 100 % de identidade nucleotídica (NI) entre si e com *B. diazoefficiens*, *B. betae*, *B. shewense* e *B. ottawaense*. Tais resultados confirmam a alta conservação desse gene para análises filogenéticas em *Bradyrhizobium*. A filogenia do espaço intergênico transcrito (ITS) agrupou as estirpes CNPSO em um clado individual com alto suporte estatístico, sendo *B. japonicum* a espécie mais relacionada. Para melhores elucidações filogenéticas no grupo em estudo, foi realizada uma análise concatenada com sequências de seis genes *housekeeping*, *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB* e *recA*, por meio da técnica de MLSA (*multilocus sequence analysis*), a qual indicou *B. diazoefficiens* como a espécie mais próxima, com 83 % de similaridade. O mesmo padrão filogenético foi verificado na filogenia dos genes *housekeeping* individuais. As filogenias dos genes de nodulação *nodC* e fixação do N<sub>2</sub> *nifH* agruparam as estirpes com *B. arachidis*, *B. forestalis* e *B. cajanus*. A estirpe CNPSO 3448 foi selecionada para análises genômicas de ANI (*average nucleotide identity*) e dDDH (*digital DNA-DNA hybridization*) com as espécies de *Bradyrhizobium* mais relacionadas. Os valores resultantes foram inferiores a 93.3 % no ANI e 53.50 % na dDDH, confirmando que as estirpes CNPSO pertencem a uma nova espécie de *Bradyrhizobium*. Os perfis de BOX-PCR indicaram variabilidade genética elevada entre as estirpes CNPSO. Também foi constatada variabilidade fenotípica, principalmente quanto à utilização de fontes C e a tolerância a antibióticos. Considerados em conjunto, esses dados suportam a descrição de uma nova espécie de *Bradyrhizobium*, para qual o nome *Bradyrhizobium niftali* foi proposto, com a estirpe CNPSO 3448<sup>T</sup> (=USDA 10051<sup>T</sup> =U687<sup>T</sup> =CL 40<sup>T</sup>) selecionada como estirpe tipo.

**Palavras-chave:** Taxonomia polifásica. *Bradyrhizobium*. Nodulação. Leguminosas. Caesalpinioideae.

KLEPA, Milena Serenato. **Polyphasic taxonomy of isolates from *Chamaecrista fasciculata* and description of the novel species *Bradyrhizobium niftali***. 2019. 99 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Plant growth and development are related to the nitrogen amounts available in the soil due to plant requirements for structural, metabolic and genetic processes. Biological nitrogen fixation (BNF) is the main process of incorporation of N<sub>2</sub>, through the enzymatic conversion that provide assimilable forms of this element to the plants. The N<sub>2</sub> fixation ability is restricted to a small group of bacteria, among which the rhizobia are highlighted by the symbiotic associations with plants of the Fabaceae family, taking place in specialized structures on the plant roots and occasionally on stems, called nodules. Recent phylogenetics studies suggested the reclassification of the traditional Fabaceae family into six subfamilies, with only Papilionoideae and Caesalpinioideae including nodulation species. To date, the *Bradyrhizobium* genus has been reported as the major microsymbiont of Caesalpinioideae; however, the diversity of rhizobia isolated from this subfamily is still poorly known. The present study aimed to perform a polyphasic analysis of rhizobia isolated from nodules of *Chamaecrista fasciculata*, a native legume caesalpinioideae, broadly found in eastern, midwestern and southern of the United States. Based on 16S rRNA analysis, the CNPSo 3394, CNPSo 3442 and CNPSo 3448 strains shared 100 % of nucleotide identity (NI) to each other, as well as with *B. diazoefficientes*, *B. betae*, *B. shewense* and *B. ottawaense*. These results confirm the high conservation of the 16S rDNA in *Bradyrhizobium*. The intergenic transcribed space (ITS) phylogeny grouped the CNPSo strains in an individual clade, with *B. japonicum* as the most related species. In order to elucidate the phylogenetic relationships of this bacterial group, we performed an MLSA (multilocus sequence analysis) analysis with six housekeeping genes, *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, and *B. diazoefficiens* was indicated as the closest species, with 83 % of similarity. The same phylogenetic pattern was verified in phylograms of the single housekeeping genes. The phylogenies of the nodulation *nodC* and the nitrogen fixation *nifH* genes grouped the CNPSo strains with *B. arachidis*, *B. forestalis* and *B. cajanus*. The genomes of CNPSo 3448 strain was sequenced and compared by ANI (average nucleotide identity) and dDDH (digital DNA-DNA hybridization) with the genomes of the nearest *Bradyrhizobium* species. All values were lower than 93.3 % in ANI and 53.50 % in dDDH, confirming that the CNPSo strains belong to a new species. The BOX-PCR profiles indicated high intraspecific genetic diversity between the strains. The most relevant differences in phenotypic features in relation to the closest *Bradyrhizobium* species were on the source C assimilation and tolerance to antibiotics. Altogether, these data support the description of the CNPSo strains as the novel species *Bradyrhizobium niftali* sp. nov., with CNPSo 3448<sup>T</sup> (=USDA 10051<sup>T</sup> =U687<sup>T</sup> =CL 40<sup>T</sup>) designated as the type strain.

**Key words:** Polyphasic taxonomy. *Bradyrhizobium*. Nodulation. Native legumes. Caesalpinioideae.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Infecção e organogênese de nódulos via pelos radiculares.....	25
<b>Figura 2.</b> Comparação entre processos de infecção e organogênese de nódulos.....	26
<b>Figura 3.</b> Micrografia comparativa de simbiossomas e cordão de infecção persistente.....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação das estirpes.....	42
<b>Tabela 2.</b> <i>Primers</i> e condições de amplificação dos genes 16S RNAr, <i>glnII</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> , <i>nodC</i> e <i>nifH</i> e espaço intergênico transcrito (ITS).....	49

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3. Referencial Teórico</b> .....	<b>18</b>
3.1 Agricultura sustentável e a fixação biológica de nitrogênio .....	18
3.2 Família Leguminosae e o gênero <i>Chamaecrista</i> .....	20
3.3 Simbiose rizóbio-leguminosa: infecção bacteriana e organogênese de nódulos radiculares .....	23
3.4 Taxonomia microbiana .....	28
3.5 Técnicas da abordagem polifásica .....	30
3.5.1 Técnicas filogenéticas .....	30
3.5.2 Técnicas genotípicas .....	33
3.5.3 Técnicas fenotípicas .....	36
3.6 Descrição de novas espécies bacterianas.....	37
3.7 Taxonomia de rizóbios e o gênero <i>Bradyrhizobium</i> .....	39
<b>4. Metodologia</b> .....	<b>42</b>
4.1 Amostragem dos nódulos radiculares .....	42
4.2 Desinfestação dos nódulos e isolamento de rizóbios .....	43
4.3 Caracterização morfológica das colônias.....	43
4.3.1 Manifestação de crescimento .....	44
4.3.2 Diâmetro das colônias .....	44
4.3.3 Alteração do pH do meio .....	44
4.3.4 Forma, borda, superfície e elevação das colônias .....	44
4.3.5 Produção de muco .....	44
4.3.6 Consistência da massa de crescimento.....	44
4.3.7 Detalhes ópticos .....	45
4.3.8 Cromogênese em YMA contendo azul de bromotimol e vermelho Congo .....	45
4.4 Caracterização fisiológica.....	45
4.4.1 Crescimento em diferentes meios e condições.....	45
4.4.2 Atividade da enzima urease.....	45
4.4.3 Utilização de fontes de C .....	46
4.4.4 Tolerância a antibióticos .....	46

4.5 Caracterização química.....	47
4.5.1 Perfil de ácidos graxos .....	47
4.6 Caracterização filogenética e genotípica .....	47
4.6.1 Extração de DNA .....	47
4.6.2 BOX-PCR .....	47
4.6.3 Amplificação por PCR .....	48
4.6.4 Sequenciamento dos genes.....	50
4.6.5 Filogenia dos genes <i>housekeeping</i> individuais, 16S RNAr, <i>nodC</i> , <i>nifH</i> e espaço intergênico transcrito (ITS) .....	50
4.6.6 Multilocus Sequence Analysis (MLSA) .....	51
4.6.7 Nucleotide Identity (NI).....	51
4.6.8 Sequenciamento do genoma.....	51
4.6.9 <i>Average Nucleotide Identity</i> (ANI) e hibridização DNA-DNA digital (HDDd) .....	51
4.6.10 Conteúdo G+C (%) .....	52
4.7 Eficiência de nodulação das estirpes .....	52
4.7.1 Escarificação .....	52
4.7.2 Desinfestação de sementes .....	52
4.7.3 Crescimento dos tratamentos .....	53
4.7.4 Cultivo em saco de polipropileno .....	53
4.7.5 Cultivo em vaso de Leonard .....	53
<b>5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Resultados e Discussão .....</b>	<b>69</b>
<b>7. Considerações Finais .....</b>	<b>99</b>

## 1. Introdução

Apesar do vasto conhecimento acumulado acerca dos papéis ecológicos dos microrganismos na biosfera, é surpreendente levar-se em conta que somente 15.448 espécies de Archaea e Bacteria haviam sido formalmente descritas até 2018, segundo a *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. A taxonomia é a ciência dedicada a classificação dos organismos de modo a tornar possível o conhecimento das relações evolutivas existentes entre eles e sobre a biodiversidade. Atualmente a abordagem polifásica é a mais aceita na classificação de microrganismos, portanto, uma combinação de métodos fenotípicos, genotípicos e filogenéticos são empregados na busca de um consenso no delineamento de espécies. No entanto, o avanço nas tecnologias de sequenciamento (*next-generation sequencing* – NGS) tem repercutido em uma classificação baseada unicamente em sequências genômicas, podendo acarretar em verdadeiras revoluções na taxonomia de procariotos.

Dentre as funções ecológicas de cada microrganismo, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos processos mais relevantes para a vida na Terra, uma vez que a utilização do N<sub>2</sub> atmosférico por um pequeno grupo de bactérias e arqueas possibilita a sobrevivência de vários outros organismos. A habilidade de reduzir o N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> é predominantemente conhecida em um grupo de bactérias capazes de se associar simbioticamente com uma ampla gama de espécies da família Fabaceae (= Leguminosae). Como resultado dessa associação, uma colaboração mútua entre os simbioss promove o desenvolvimento de uma estrutura especializada nas raízes e, ocasionalmente, no caule, denominado nódulo, onde ocorre a FBN. Estas bactérias são coletivamente denominadas rizóbios e disponibilizam formas assimiláveis do N fixado à leguminosa hospedeira, em troca de produtos da fotossíntese.

Até recentemente, a família Fabaceae era tradicionalmente dividida nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (= Faboideae). Entretanto, um amplo estudo filogenético realizado entre as leguminosas sugeriu a re-circunscrição desta família em Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Papilionoideae. Apesar da nodulação ser considerada rara em Caesalpinioideae, *Chamaecrista* é um dos gêneros nodulíferos mais promissores entre as leguminosas. Diferindo quanto aos mecanismos de nodulação, as espécies de *Chamaecrista* variam entre características primitivas e avançadas, propondo um evento de origem de nodulação próprio nesse gênero. Conforme relatos em vários continentes, o gênero *Bradyrhizobium* tem sido o principal

simbionte isolado, no entanto, os dados são limitados e, até o momento, somente *Bradyrhizobium ripae* foi formalmente descrita como nova espécie isolada de *Chamaecrista biensis*.

Embora *Bradyrhizobium* tenha sido um dos primeiros gêneros de rizóbios conhecidos, sua taxonomia ainda permanece complexa, estimando-se que grande parte das espécies continua desconhecida. Levando em conta a predominância do gênero *Bradyrhizobium* em solos tropicais, estes rizóbios apresentam uma ampla faixa hospedeira podendo ser encontrados associados com leguminosas de importância econômica até plantas primitivas da subfamília Caesalpinioideae, permitindo sugerir que este gênero é o simbionte ancestral de Fabaceae. Sendo assim, estudos focados nessas leguminosas-chave, como é o caso de *Chamaecrista fasciculata*, podem contribuir com questões sobre a história evolutiva da simbiose entre rizóbios e leguminosas, bem como para ampliar o conhecimento sobre a diversidade do gênero *Bradyrhizobium*.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Realizar uma análise polifásica de propriedades fenotípicas, genéticas e filogenéticas de três estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos radiculares de *Chamaecrista fasciculata*, uma leguminosa nativa das regiões leste, centro-oeste e sul dos Estados Unidos, visando determinar a diversidade desse grupo de bactérias.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar estirpes isoladas de nódulos de *Chamaecrista fasciculata* quanto aos aspectos morfofisiológicos e quimiotaxonômicos;
- b) Analisar a diversidade genética dos rizóbios por meio das técnicas de BOX-PCR; ANI (*Average Nucleotide Identity*); NI (*Nucleotide Identity*), bem como, determinar o conteúdo de guaninas e citosinas presente no genoma;
- c) Investigar as relações filogenéticas dos rizóbios por meio de análises do gene ribossomal 16S RNAr, espaço intergênico transcrito (ITS) e MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) com os genes *housekeeping atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*, visando determinar a posição taxonômica das estirpes;
- d) Inferir propriedades simbióticas dos rizóbios por meio da filogenia dos genes simbióticos *nodC* e *nifH* e testes de capacidade de nodulação em *Chamaecrista fasciculata* e outras espécies de leguminosas.

### 3. Referencial Teórico

#### 3.1 Agricultura sustentável e a fixação biológica de nitrogênio

Dentre as exigências nutricionais de uma planta, o nitrogênio (N) é o elemento requerido em maior quantidade. Isso se deve aos importantes processos estruturais, metabólicos e genéticos, nos quais o N é um constituinte essencial para a formação de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas (DE BRUIJN, 2015; FAQUIN, 2005; TAIZ et al., 2017). Embora o N, na forma de  $N_2$ , seja predominante entre os gases da atmosfera terrestre, a tripla ligação covalente que envolve os dois átomos é extremamente forte e estável. Desta forma, a assimilação direta por plantas e pela grande maioria dos organismos vivos é inviabilizada (BRILL, 1977). A limitação de tal nutriente no solo afeta diretamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal em ecossistemas naturais ou cultivos agrícolas. Para a nutrição das plantas, o N deve ser fornecido por formas inorgânicas combinadas ou fixadas, como nitrato ( $NO_3^-$ ) e amônio ( $NH_4^+$ ), passíveis de metabolização (TAIZ et al., 2017).

No solo, o N disponível para as plantas é representado por compostos inorgânicos, decorrentes de processos da decomposição da matéria orgânica, como a amonificação e a nitrificação, cuja disponibilidade depende das condições ambientais e da natureza química da matéria orgânica presente no solo (SIQUEIRA et al., 1994). Em relação ao território brasileiro, as condições climáticas e de umidade aceleram os processos de decomposição da matéria orgânica, resultando em perdas por volatilização e lixiviação. Neste caso, o reservatório de N torna-se limitado e rapidamente esgotado ao longo dos cultivos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Outra maneira de suprir as exigências vegetais se dá por meio de processos naturais, tais como descargas elétricas, combustão e vulcanismo. Este processo é denominado fixação não biológica e, da mesma forma que o primeiro, contribui com uma pequena porcentagem do aporte de N à biosfera (NEWTON, 2000; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

A introdução da fertilização nitrogenada em culturas agrícolas acarretou em um substancial aumento na produção de alimentos. Nessas circunstâncias, a utilização desses insumos foi repercutida como a solução mais eficaz para a deficiência nutricional de plantas, sendo amplamente utilizada até os dias atuais (GRAHAM; VANCE, 2003). Por outro lado, o processo de fixação industrial envolve elevados custos financeiros e ao meio ambiente. Estima-se que a produção de uma tonelada de  $NH_3$  demande a combustão de,

aproximadamente, seis barris de petróleo, uma fonte de energia não renovável que, conseqüentemente, implica na emissão de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), um agravante do efeito estufa (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; FERGUSON et al., 2010).

Além disso, outros severos impactos ambientais estão associados às práticas de fertilização nitrogenada. Apesar de considerada uma fonte prontamente disponível, em geral, as plantas não assimilam todo o N aplicado de forma eficiente, resultando em perdas de, aproximadamente, 50 % do insumo sob condições tropicais. O excesso de N no solo tem a possibilidade de ser lixiviado para rios, lagos, reservatórios e lençóis freáticos, colocando em risco a biodiversidade aquática e a saúde humana, além disso, o solo pode passar por um processo de acidificação. Esse N restante ainda é passível de volatilização e desnitrificação, resultando na emissão de gases de efeito estufa, como os óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) (ERISMAN et al., 2013; DE BRUIJN, 2015).

O principal meio de incorporação de N à biosfera se dá pela conversão enzimática do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) a amônia (NH<sub>3</sub>), em um processo realizado exclusivamente por organismos procarióticos, denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN). Ambientes naturais e agrícolas são beneficiados pela ação de organismos fixadores de nitrogênio, tanto pela reposição do conteúdo de N perdido via água ou gases, quanto pela redução do uso de fertilizantes nitrogenados. Nessas circunstâncias, essa etapa do ciclo do N é quase tão importante para a vida quanto a fotossíntese e contribui com 65 % do aporte total deste nutriente adentrado na Terra (DIXON; KAHN, 2004; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTINEZ-ROMERO, 2013).

Microrganismos fixadores de nitrogênio estão distribuídos em pouco mais de 100 filos do domínio Bacteria, enquanto que em Archaea, são restritos apenas às metanogênicas pertencentes ao filo Euryarchaeota (ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTINEZ-ROMERO, 2013; DE BRUIJN, 2015). A habilidade de fixar N<sub>2</sub> é atribuída à presença dos genes *nif*, cujos produtos resultam na síntese do complexo enzimático chave da FBN, a nitrogenase. Em sua estrutura clássica, a nitrogenase é composta por Ferro-proteína (Fe-proteína) e Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), sendo esta última subunidade a portadora do sítio ativo da enzima. No entanto, ambas são altamente sensíveis ao oxigênio (O<sub>2</sub>) e dependentes de elevadas quantidades de energia (POSTGATE, 1982; DIXON; KAHN, 2004).

A redução do N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> envolve a ação de carreadores de elétrons, tais como ferredoxina ou flavodoxina. Estes reduzem a Fe-proteína, a qual subseqüentemente transfere os elétrons recebidos para a MoFe-proteína, em um processo que demanda a hidrólise de dois ATP. O substrato ligado ao sítio ativo é reduzido, ao passo que prótons são reduzidos a H<sub>2</sub>. A redução completa de N<sub>2</sub> é dada pelo acúmulo de oito elétrons. Nestas circunstâncias, a estequiometria da reação consiste em:  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16MgATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16P_i$  (KIM; REES, 1994).

Apesar de encontrados em habitats variados, o solo abriga uma vasta diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, também denominadas diazotróficas. Além das bactérias de vida livre, outras têm a possibilidade de estabelecer associações com plantas em diferentes graus de especificidade, podendo ser diferenciadas como associativas, endofíticas e simbióticas. Estas últimas são compreendidas por bastonetes Gram-negativos e aeróbicos, coletivamente denominadas rizóbios (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; PEIX et al., 2015; MUS et al., 2016). Em meio a tais associações, os rizóbios se destacam pela habilidade de estabelecerem relações simbióticas com plantas da família Fabaceae (= Leguminosae). Esta relação é capaz de promover alterações em ambos os simbioss, culminando no desenvolvimento de estruturas especializadas, denominadas nódulos, as quais são encontradas nas raízes e, ocasionalmente, nos caules. No interior destas estruturas, as bactérias recebem proteção contra o O<sub>2</sub> e suprimento de carbono, possibilitando a redução do N<sub>2</sub> de forma eficiente, o qual é distribuído aos tecidos vegetais (OLDROYD; DOWNIE, 2004; VELÁZQUEZ; SILVA; PEIX, 2010).

### **3.2 Família Fabaceae e o gênero *Chamaecrista***

Sendo composta por aproximadamente 751 gêneros e 19.500 espécies, a família Fabaceae é considerada a terceira maior entre as angiospermas (LPWG, 2013). Tradicionalmente, as leguminosas são separadas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilinoideae (=Faboideae), nas quais a ocorrência de nodulação é considerada rara em espécies de Caesalpinioideae e mais abrangente em Mimosoideae e Papilinoideae (DE FARIA et al., 1984; CORBY, 1988; DIABATE et al., 2005; SPRENT, 2007).

No entanto, um estudo baseado na filogenia de um importante marcador molecular de leguminosas, o gene plastidial *matK*, foi realizado em cerca de 90 % dos gêneros

já descritos na família, sugerindo uma nova classificação para Fabaceae. Além disso, características morfológicas detalhadas têm sido incluídas na taxonomia de leguminosas, como por exemplo, a presença de nodulação. A proposta é que a família seja composta por seis subfamílias, sendo elas: Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Papilionoideae (ANDREWS; ANDREWS, 2017; LPWG, 2017; SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2017).

Nesta nova classificação, a parafilética subfamília Caesalpinioideae abrange apenas as tribos *Cassieae*, *Caesalpinieae* e a antiga subfamília Mimosoideae. Sendo assim, essa subfamília agora é representada pelo clado Mimosoideae-Caesalpinieae-Cassieae (MCC) já conhecido entre as leguminosas. Apesar disso, essa reclassificação de Mimosoideae tem gerado discussões, sendo considerada um clado distinto dentro de Caesalpinioideae. As subfamílias Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae e Duparquetioideae não apresentam habilidade de nodulação e foram reclassificadas de tribos de Caesalpinioideae para a atual categoria. Por fim, a sexta subfamília foi mantida com seu caráter monofilético como Papilionoideae (DIABATE et al., 2005; LPWG, 2017; SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2017).

A origem da nodulação na família Fabaceae ainda é uma característica extensivamente discutida, tendo a possibilidade de se afirmar que houveram vários eventos de origem de nodulação independentes entre os grupos (DOYLE, 2011). Além de prevalecer no clado mimosoideae, a nodulação em Caesalpinioideae está presente tanto na tribo *Caesalpinieae*, sendo representada pelos gêneros *Dimorphandra*, *Erythropleum*, *Campsiandra*, *Jacqueshueberia*, *Melanoxylon*, *Tachigali* e *Moldenhawera*, quanto na tribo *Cassieae*, onde o gênero *Chamaecrista* se destaca por ser o único capaz de nodular (DE FARIA et al., 1984; DIABATE et al., 2005; FONSECA et al., 2012; SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2013; YAO et al., 2015).

Abrangendo cerca de 330 espécies, o gênero *Chamaecrista* foi o primeiro a ser segregado do gênero *Cassia*. Em relação a sua geografia, o gênero apresenta distribuição Pantropical, sendo menos recorrente na África, Ásia e Austrália, porém, é um dos únicos gêneros de leguminosas nodulíferas que se estende para áreas temperadas (IRWIN; BARNEBY, 1976; SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2013). Conforme Souza e Bortoluzii (2015) enumeraram, a flora brasileira abrange cerca de 256 espécies de *Chamaecrista*, dentre as quais 207 são endêmicas do país, ocorrendo principalmente nos estados da Bahia e Minas Gerais, cujos Campos Rupestres e domínios de Cerrado apresentam elevados níveis de

endemismo, sendo considerados grandes centros de diversificação deste gênero (BARNEBY, 1994, 1999; DE SOUZA; DA SILVA, 2015; RANDO et al., 2016). As espécies de *Chamaecrista* variam entre hábitos arbóreo, arbustivo e herbáceo (TOZZI, 2016), havendo relatos de nodulação em todos esses tipos de plantas (DE FARIA; MCINROY; SPRENT, 1987; DIABATE et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2017).

Nativa do leste, centro-oeste e sul dos Estados Unidos, a espécie *Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene é encontrada em regiões de pradarias, florestas de savana, pastagens, entre outros ecossistemas, sobrevivendo em solos arenosos ou argilosos, com pouca disponibilidade de água e pH ácido (HOUCK, 2006). As plantas são anuais e herbáceas, representadas por flores amarelas, comumente utilizadas para ornamentação e produção de mel (MORRIS, 2012). Suas folhas e sementes são amplamente utilizadas como fonte nutricional para animais selvagens, contudo, apresentam uma substância catártica que é tóxica e pode levar à morte (USDA, 2011a). Quando associadas com certas plantas, reduzem consideravelmente a herbivoria, podendo ser aplicadas no controle biológico de pragas (JEZOREK; STILING; CARPENTER, 2011). Além disso, por apresentar uma rápida taxa de crescimento e habilidade de nodulação, *C. fasciculata* tem apresentado grande potencial no controle da erosão, melhoria da fertilidade do solo e reabilitação de áreas degradadas (TLUSTY; GROSSMAN; GRAHAM, 2004; USDA, 2011b; HENSON; CORY; RUTTER, 2013; BEYHAUT et al., 2014).

Apesar de poucas informações sobre a nodulação em *C. fasciculata*, Parker e Kennedy (2006) isolaram rizóbios pertencentes a linhagens do grupo *B. elkanii* em New Haven, Connecticut, EUA. Em relação à FBN, Gopalasubramaniam et al. (2008) indicaram a proteína leghemoglobina de *C. fasciculata* como um suposto ancestral da leghemoglobina dos demais legumes. Nesse contexto, recomenda-se a utilização de *C. fasciculata* como um modelo biológico dentro de leguminosas, tendo a possibilidade de auxiliar na resolução de questões associadas à origem da família Fabaceae e da nodulação. Além disso, o pequeno porte de *C. fasciculata*, bem como, o rápido tempo de geração, o genoma sequenciado e a compatibilidade com diversos ecossistemas facilitam o estudo em laboratório, podendo ampliar as perspectivas em sistemas experimentais para além dos modelos de papilionoideae comumente estudadas, como *Glycine max*, *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* (SINGER et al., 2009).

### 3.3 Simbiose rizóbio-leguminosa: infecção bacteriana e organogênese de nódulos radiculares

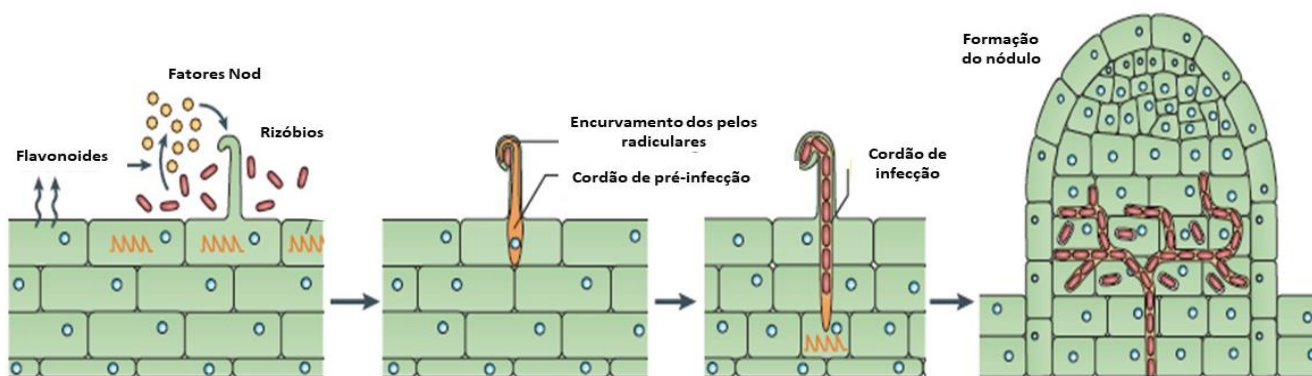
Diante da diversidade de macro e microsimbiontes existentes e das condições ambientais nos quais são submetidos, três diferentes mecanismos de nodulação podem ocorrer, sendo eles: infecção via pelos radiculares; infecção por rachaduras ou, ainda, através da epiderme intacta (SPRENT; DE FARIA, 1989; SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2013). A simbiose rizóbio-leguminosa consiste em duas etapas consecutivas de infecção e organogênese de nódulos. De acordo com a leguminosa à qual estão associados, os rizóbios podem induzir dois tipos principais de nódulos, sendo que as diferenças entre eles são úteis para taxonomia de leguminosas. Nódulos indeterminados são caracterizados por um crescimento meristemático apical persistente, que resulta em uma morfologia alongada e por vezes ramificada, presentes em todos os representantes da subfamília Caesalpinioideae e Mimosoideae. Já os nódulos determinados não apresentam um meristema e as divisões celulares cessam logo após o início da organogênese. A morfologia é esférica decorrente do aumento de tamanho das células ao invés de divisões celulares e são comumente encontrados na soja (*Glycine max*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (HIRSCH, 1992; SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2013, 2017).

O processo de infecção via pelos radiculares tem sido foco da maioria dos estudos da simbiose rizóbio-leguminosa. Leguminosas que realizam esse tipo de infecção podem ser exemplificadas pela soja, feijão, alfafa e ervilha. O primeiro contato entre os simbiontes se dá via exsudados radiculares, dentre os quais, os flavonoides atraem as bactérias para a rizosfera da planta, estimulando a multiplicação celular e, principalmente, interagindo com proteínas bacterianas (*nodD*) que regulam a transcrição dos genes de nodulação (*nod*, *noe* e *nol*). Esses genes participam da síntese dos fatores de nodulação (fatores Nod), moléculas sintetizadas pelos rizóbios e essenciais à nodulação e estruturalmente representadas por lipoquitoligossacarídeos (LCOs) de cadeia variável. Os fatores Nod são codificados pelos genes *nod*, localizados no operon *nodABC*, enquanto que os produtos de outros genes de nodulação (como os genes *noe* e *nol*) atuam provocando modificações em tais fatores conferindo, assim, especificidade ao hospedeiro (SCHULTZE; KONDOROSI, 1998; HUNGRIA et al., 1994; JONES et al., 2007).

Os fatores Nod participam tanto da infecção bacteriana, quanto no desenvolvimento dos nódulos, provocando alterações fenotípicas e fisiológicas na planta

hospedeira, como o encurvamento de pelos radiculares, multiplicação de células corticais e, conseqüentemente, o desenvolvimento do primórdio do nódulo. Em conjunto com os fatores Nod, os rizóbios ainda liberam polissacarídeos de superfície que favorecem a invasão bacteriana via pelo radicular. Em resposta, as paredes celulares vegetais são dissolvidas e um cordão de infecção é formado na extremidade do pelo radicular encurvado. À medida que as bactérias se multiplicam, o cordão de infecção se estende ao córtex vegetal, possibilitando a penetração dos rizóbios nas células do primórdio do nódulo (HUNGRIA et al., 1994; OLDROYD et al., 2011). Um exemplo desse processo é ilustrado na figura 1 e figura 2c. No citoplasma, as bactérias são envolvidas por uma membrana peribacteroidal advinda da célula hospedeira, a qual mantém os rizóbios em compartimentos denominados simbiossomas, onde se diferenciam em bacteroides capazes de fixar nitrogênio atmosférico, conforme exemplificado na figura 3b (SADOWSKY; GRAHAM; SUGAWARA, 2013).

No interior dos nódulos, para que a conversão enzimática de  $N_2$  a  $NH_3$  seja viabilizada pelos bacteroides, faz-se necessária a expressão da proteína leghemoglobina, a qual se liga ao  $O_2$  e tem como função manter um ambiente de microaerofilia permissivo à FBN. A expressão de leghemoglobina pode alterar a coloração do interior dos nódulos, sendo um indicativo para FBN. Quando apresentam coloração rósea, indicam a presença ativa da proteína, ao contrário do que é visualizado em nódulos com o interior branco (JONES et al., 2007); em nódulos senescentes ou ineficientes, a coloração é escura ou esverdeada. A  $NH_3$  resultante da atividade da nitrogenase se associa aos íons  $H^+$  abundantes nos bacteroides, sendo então convertida a íons amônio ( $NH_4^+$ ) e distribuída aos tecidos vegetais na forma de compostos orgânicos de N, como as amidas, aminoácidos e ureídeos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; SANTOS; REIS, 2008). Desta forma, a associação simbiótica entre rizóbios e leguminosas confere vantagem ecológica às diversas espécies da família Fabaceae, quando comparada com vegetais pertencentes a outras famílias botânicas (PEIX et al., 2015).



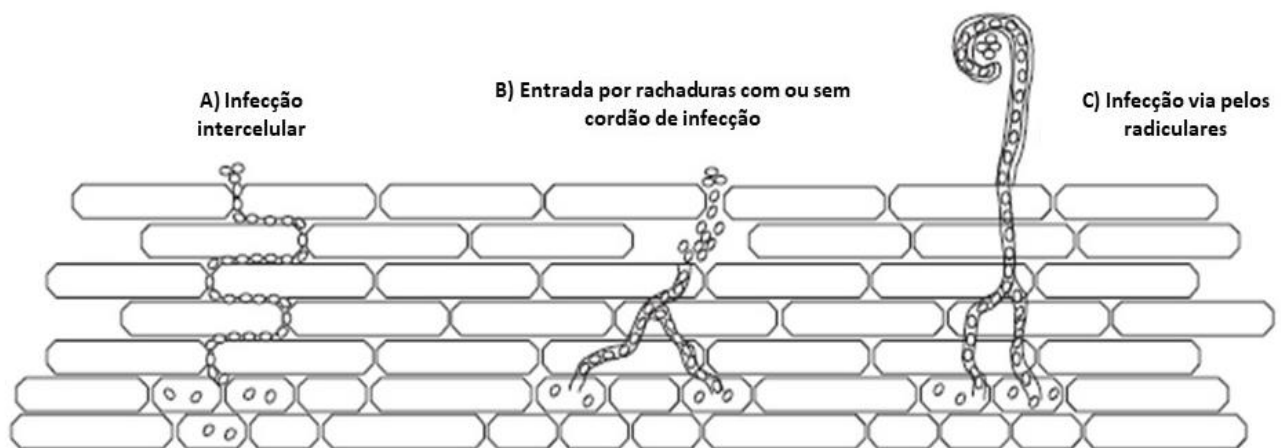
**Figura 4.** Infecção e organogênese de nódulos via pelos radiculares. A) Troca de sinais moleculares entre rizóbios e raiz da planta. B) Encurvamento dos pelos radiculares e início da infecção. C) Formação do cordão de infecção. D) Penetração das bactérias no primórdio do nódulo. Modificada de Oldroyd (2013).

Durante um longo período, os genes de nodulação foram considerados universais entre os rizóbios. No entanto, Giraud et al., (2007) relataram a ausência dos genes *nodABC* no genoma de duas estirpes de *Bradyrhizobium* fotossintéticas, capazes de desenvolverem nódulos nos caules de duas espécies da leguminosa aquática do gênero *Aeschynomene*, indicando a existência de um mecanismo alternativo na organogênese dos nódulos. Além disso, Menna e Hungria (2011) encontraram uma alta diversidade nos genes de nodulação de 40 estirpes de *Bradyrhizobium*, dentre as quais, três estirpes isoladas de diferentes espécies de leguminosas não apresentaram os genes *nodA* e *nodY/K*, apontando que a ausência de genes de nodulação pode não ser uma característica exclusiva de *Bradyrhizobium* fotossintéticas nodulíferas de caule.

Embora grande parte dos estudos de simbiose sejam voltados para o processo via pelos radiculares, processos alternativos de infecção persistem em cerca de 25% de Fabaceae (SPRENT, 2007). De modo geral, esses processos de invasão não usuais envolvem a penetração do espaço intercelular do hospedeiro via cavidades naturalmente existentes na epiderme da raiz, denominados entrada por rachaduras (*crack entry*) (figura 2b). Esse tipo de infecção tem sido descrito em certas leguminosas subtropicais, cujos mecanismos são similares, porém, normalmente variam em relação ao sítio de penetração e ao modo de propagação dos rizóbios ao longo do córtex da raiz, podendo ser observada a presença ou ausência de cordões de infecção (SPRENT; FARIA, 1989; BOOGERD; VAN ROSSUM, 1997; HADRI et al., 1998; SPRENT, 2007; IBÁÑEZ; WALL; FABRA, 2017).

Dentre as leguminosas que realizam tais processos, a mimosoideae aquática *Neptunia natans* é invadida por *Rhizobium* mediante fissuras ocasionadas pela emergência das raízes laterais e a disseminação rizobiana é dada por células colapsadas, onde as bactérias se acumulam em uma estrutura semelhante a cordões de infecção (SUBBA-RAO et al., 1995). Na simbiose entre *Arachis hipogae* (amendoim) e *Bradyrhizobium* (CHANDLER, 1978; BOOGERD; van ROSSUM, 1997) e *Stylosanthes* e *Rhizobium* (CHANDLER; DATE; ROUGHLEY, 1982), ambas papilonoideae, o acesso ao meio intercelular do hospedeiro se dá por espaços entre os pelos radiculares e as células epidérmicas. Entretanto, o modo como as bactérias se propagam difere, ocorrendo através da lamela média e por meio de um progressivo colapso de células previamente infectadas, respectivamente.

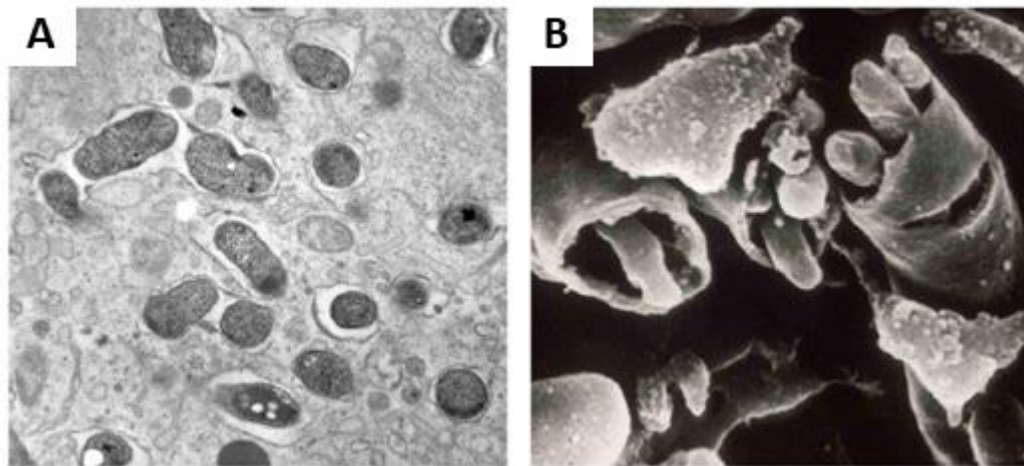
Além disso, um terceiro modo de infecção pode ser exemplificado por *Mimosa scabrella*, uma leguminosa arbórea invadida por *Rhizobium* através da epiderme intacta (figura 2a). Nesse caso, as bactérias apresentam enzimas capazes de degradar o mucigel e camadas de parede vegetal. Sendo assim, adentram o meio intercelular hospedeiro em locais onde há apenas uma camada de parede (DE FARIA; HAY; SPRENT, 1988; SPRENT; FARIA, 1989).



**Figura 5.** Comparação entre processos de infecção e organogênese de nódulos. A) Infecção intercelular ou através da epiderme intacta. B) Infecção por meio de rachaduras (*crack entry*), podendo ser observado a presença de cordões de infecção ou não. C) Infecção via pelos radiculares com o desenvolvimento do cordão de infecção. Modificado de Madsen et al., (2010).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de infecção e organogênese de nódulos na subfamília Caesalpinioideae (FONSECA et al., 2012; IBÁÑEZ; WALL; FABRA, 2017). O primeiro trabalho da estrutura dos nódulos nesta subfamília foi realizado por de Faria; McInroy; Sprent (1987), que revelaram a ocorrência de bacteroides confinados a uma fina camada de parede celular hospedeira, em uma estrutura semelhante a um cordão de infecção.

Ao contrário do comum, a liberação dos rizóbios no citoplasma não foi observada em todas as espécies analisadas, as quais variaram entre hábitos arbóreo e arbustivo. A referida estrutura é denominada cordão de infecção persistente ou cordão de fixação, podendo ser encontrada em poucas espécies de Papilionoideae, bem como em *Parasponia*, uma não leguminosa capaz de estabelecer relação simbióticas com rizóbios, mas não em Mimosoideae (DE FARIA; McINROY; SPRENT, 1987; TRINICK, 1979). Um exemplo desta estrutura está representado na figura 3b. A partir disso, sugere-se que os cordões de infecção surgiram em estágios primitivos do processo de compatibilidade entre hospedeiro e microsimbionte, não sendo primeiramente utilizados para infecção, tal como ocorre via pelos radiculares em leguminosas “avançadas” (DE FARIA; McINROY; SPRENT, 1987; SPRENT; DE FARIA, 1989; SPRENT, 2007).



**Figura 6.** Micrografia comparativa de simbiossomos e cordão de infecção persistente. (A) bacteroides liberados do cordão de infecção em simbiossomos e (B) bacteroides retiros em cordão de infecção persistente ou cordão de fixação. Modificado de Sprent, Ardley e James (2013).

Apesar dos cordões de infecção persistentes serem comumente encontrados em leguminosas de Caesalpinioideae, o gênero *Chamaecrista* foi avaliado quanto à organogênese dos nódulos radiculares, sendo designado por apresentar uma posição anômala em termos evolutivos. Dentre as 14 espécies do gênero analisadas por Naisbitt; James e Sprent (1992), apenas três apresentaram rizóbios persistindo em cordões de infecção; as três leguminosas arbóreas foram coletadas no Brasil, sugerindo uma característica geograficamente distribuída. Já em *C. fasciculata* advinda dos Estados Unidos, não foram observados cordões de infecção persistentes. Contudo, em comparação com as demais espécies, esta apresentou a maior proporção de células infectadas contendo uma alta densidade de bactérias, típico de leguminosas cujos bacteroides são liberados na forma de

simbiossomas no citoplasma (NAISBITT; JAMES; SPRENT, 1992). É proposto, ainda, que a infecção em *C. fasciculata* ocorra por meio de rachaduras e posteriormente desenvolva os cordões de infecção, uma vez que apesar dos cordões estarem presentes em pelos radiculares, eram abortados, sendo encontrado em algumas células do nódulo (HIRSCH et al., 2009). Desta forma, a recorrência dos microssimbiontes de *Chamaecrista* apresentando cordões de infecção persistente em espécies arbóreas, e a liberação em simbiossomas em herbáceas, pode representar seu próprio evento evolutivo de nodulação (DOYLE, 2011; NAISBITT; JAMES; SPRENT, 1992; SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2013).

Ainda não se conhece a exata relação desses mecanismos de infecção alternativos e a ausência dos genes *nodABC* (GIRAUD et al., 2007). O que tudo indica é que as leguminosas que apresentam mecanismos de infecção alternativos não utilizam os fatores Nod nas primeiras etapas de reconhecimento e sinalização, visto que a porta de entrada não é o pelo radicular. No entanto, tais moléculas normalmente são requeridas em outras etapas, como a indução da divisão de células corticais e a formação do primórdio do nódulo, como é o caso de *A. hypogae* (IBÁÑEZ; FABRA, 2011). Outro exemplo é *Sesbania rostrata*, que é invadida por rachaduras epidérmicas, sendo os fatores Nod necessários para induzir a morte celular e permitir o desenvolvimento de um “pacote” de infecção, conduzindo à colonização do córtex vegetal (CAPOEN et al., 2010). Rizóbios que não apresentam genes *nodABC* podem apresentar invasão através de rachaduras, porém, a organogênese dos nódulos provavelmente depende do sistema de secreção funcional do tipo III (T3SS), uma maquinaria secretora inicialmente identificada em patógenos de animais e plantas, ou via mecanismos ainda desconhecidos (OKAZAKI et al., 2013, 2015).

### **3.4 Taxonomia microbiana**

A taxonomia microbiana é o estudo que organiza os microrganismos de maneira ordenada, através de um sistema hierárquico capaz de presumir as relações evolutivas que ocorrem naturalmente subsidiando, assim, a compreensão da origem da vida (MOORE et al., 2010; KÄMPFER, 2012; KÄMPFER; GLAESER, 2012). A terminologia da palavra taxonomia tem sido recorrentemente discutida. Em muitos estudos, é considerada como sinônimo de sistemática, no entanto, outros autores definem a taxonomia como a teoria e a prática da classificação de organismos, baseada nas premissas da sistemática, a qual inclui fatores evolutivos (STACKEBRANDT, 2006).

Segundo Tindall et al. (2010), a taxonomia bacteriana envolve três processos fundamentais correlacionados. A classificação é a etapa compreendida pela disposição dos organismos de maneira hierárquica em categorias, de acordo com a similaridade (por exemplo, domínio, filo, classe, ordem, família, gênero, espécie). Já a nomenclatura tem por finalidade atribuir nomes às categorias taxonômicas definidas, sendo as categorias de família, gênero, espécie e subespécie para bactérias determinadas conforme os critérios propostos no “*International Code of Nomenclature of Bacteria*”. Tratando-se de estirpes com taxonomia ainda desconhecida, isto é, estirpes recém isoladas, o último processo chave da taxonomia, a identificação, é levado em conta. Metodologias simples e rápidas são empregadas com a finalidade de alocar a estirpe em um grupo taxonômico já classificado e nomeado (VANDAMME et al., 1996; MOORE et al., 2010; KÄMPFER; GLAESER, 2012). No entanto, se essas estirpes apresentarem uma taxonomia ainda indefinida, uma minuciosa análise deverá ser realizada, a fim de descrever o novo táxon e, posteriormente, nomeá-lo, evidenciando, assim, a complementariedade dos processos.

Os trabalhos pioneiros na classificação microbiana foram implementados por Ferdinand Cohn (1872-1875), que organizou um esquema de classificação composto por seis gêneros distinguidos com base em critérios morfológicos (STACKEBRANDT, 2006). À medida que novas técnicas foram desenvolvidas, características fisiológicas e bioquímicas também passaram a ser consideradas, bem como a utilização de marcadores quimiotaxonômicos, visando à universalização de um sistema de classificação microbiana (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2001). Com a sistematização dos computadores, a taxonomia numérica garantiu maior robustez à classificação de organismos (VANDAMME; PEETERS, 2014). Nas décadas seguintes, estudos com o DNA impulsionaram o desenvolvimento de técnicas moleculares, tais como a determinação do conteúdo de guaninas e citosinas no genoma (mol% G+C) e a hibridização DNA-DNA (HDD), as quais sugeriam que os microrganismos poderiam ser apropriadamente classificados a partir de comparações entre genomas (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2001; MOORE et al., 2010; TINDALL et al., 2010).

A busca de marcadores moleculares que refletissem as relações evolutivas entre os organismos culminou em uma verdadeira revolução na taxonomia microbiana. Com o surgimento da técnica de PCR e sequenciamento dos genes que compõem a subunidade menor do ribossomo, 16S RNAr (procariotos) e 18S RNAr (eucariotos), todos os organismos

vivos foram agrupados em uma categoria superior ao reino, denominada domínio, sendo eles, Bacteria, Archaea e Eukarya. Nesse cenário, foi estabelecido um novo sistema taxonômico hierárquico, baseado em um marcador molecular, o qual possibilitou a inclusão de inferências filogenéticas na classificação microbiana (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; STALEY, 2006; KÄMPFER; GLAESER, 2012).

Os caminhos percorridos pela taxonomia microbiana ao longo das décadas, associados ao desenvolvimento tecnológico, permitiram conceituar a abordagem de classificação dos microrganismos amplamente utilizada atualmente. Denomina-se taxonomia polifásica o conjunto de informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas dos microrganismos, as quais indicam uma unanimidade na determinação de novas taxa (VANDAMME et al., 1996; VANDAMME; PEETERS, 2014; ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2015).

### **3.5 Técnicas da abordagem polifásica**

#### **3.5.1 Técnicas filogenéticas**

Estudos da evolução de grupos bacterianos se baseiam principalmente na filogenia de genes constitutivos, como os ribossomais e *housekeeping*. Genes ribossomais são encontrados em células de todos organismos vivos e seu papel fundamental na síntese de proteínas fez com que, ao longo da evolução, sua função fosse mantida, de modo a torná-los conservados (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). Em relação aos procariotos, as sequências do gene 16S RNAr apresentam aproximadamente 1.500 pares de bases (pb), o que facilitou o desenvolvimento de softwares capazes de interpretá-las. Por consequência, uma diversidade de sequências foi depositada em bancos de dados mundiais (STACKEBRANDT, 2006; CASE et al., 2007; KÄMPFER; GLAESER, 2011). De acordo com Velázquez et al. (2017), o sequenciamento do 16S RNAr forneceu informações relevantes para a taxonomia dos rizóbios, promovendo inúmeras reclassificações entre as espécies descritas, as quais eram anteriormente classificadas em relação à planta hospedeira.

Apesar do 16S RNAr ser considerado um gene estável geneticamente por apresentar regiões que carregam informações sobre eventos evolutivos primitivos, dadas por regiões de alto grau de conservação, é possível encontrar regiões variáveis (LUDWIG et al., 1998). Algoritmos matemáticos baseados em modelos de evolução avaliam duas sequências alinhadas de acordo com o número e o tipo da divergência, resultando em árvores

filogenéticas, por onde as inferências são realizadas (LUDWIG; KLENK, 2001). O grau de divergência presente no 16S RNAr permite estimar a distância filogenética entre estirpes, por esse motivo, a molécula é considerada um cronômetro molecular na taxonomia de procariotos (STACKEBRANDT, 2006).

No entanto, para o delineamento de espécies, o poder de resolução do 16S RNAr tem sido extensivamente discutido, principalmente quando se trata de espécies muito próximas filogeneticamente, como é o caso do gênero *Bradyrhizobium*. É possível que haja uma predominância das regiões conservadas, sendo assim, duas estirpes podem compartilhar sequências do gene idênticas e variar em relação a outras regiões do genoma, restringindo essa análise à uma identificação a nível de gênero (STACKEBRANDT et al., 2002; KÄMPFER; GLAESER, 2011). Além disso, já foi relatada a presença de heterogeneidade entre múltiplas cópias do 16S RNAr presentes no genoma, podendo resultar em uma subestimação da diversidade microbiana (PEI et al., 2010; KIM et al., 2014). Ao contrário do que se acreditava, alguns estudos evidenciaram a presença de transferência horizontal de tais genes entre alguns taxa bacterianos (SCHOULS; SCHOT; JACOBS, 2003), o que pode promover interpretações errôneas de árvores filogenéticas (ZHI et al., 2012).

Diante das limitações com a análise exclusiva do gene 16S RNAr, a técnica de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) vem sendo utilizada para uma resolução mais acurada de espécies (STACKEBRANDT et al., 2002; GEVERS et al., 2005; KÄMPFER; GLAESER, 2011). A técnica consiste na concatenação de vários genes fundamentais do metabolismo basal bacteriano (*housekeeping*), devido ao grau de conservação e onipresença nas estirpes (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Apesar de conservados, os genes *housekeeping* apresentam uma taxa de evolução mais acelerada quando comparados aos genes ribossomais gerando, assim, maiores informações filogenéticas. A concatenação consiste na análise conjunta e ordenada de tais sequências, permitindo um efeito “tampão” contra os eventos de recombinação e transferência horizontal possíveis na análise de um único gene (GEVERS et al., 2005; SCHLEIFER, 2009).

As principais exigências da técnica são quanto aos genes escolhidos, os quais necessitam estar presentes em uma única cópia no genoma, apresentar tamanho condizente com a quantidade de informações necessárias para reconstruções filogenéticas e a capacidade do sequenciador. Além disso, os dados resultantes devem apresentar congruência com 16S RNAr, HDD ou ANI (THOMPSON et al., 2005; VANDAMME; PEETERS, 2014;

GLAESER; KÄMPFER, 2015). O número de genes utilizados reflete diretamente o poder discriminatório da técnica, sendo recomendado a utilização de cinco genes ou mais (STACKEBRANDT et al., 2002; GLAESER; KÄMPFER, 2015). A filogenômica se baseia na análise filogenética através de dados genômicos. Alguns softwares disponíveis realizam inferências filogenéticas por meio de 31 a 400 genes *housekeeping* retirados do genoma. Sendo assim, é capaz de fornecer maiores informações filogenéticas, especialmente para categoria gênero ou níveis mais elevados. Futuramente, espera-se que os táxons mal classificados possam ser reorganizados usando tal abordagem (CHUN et al., 2018).

Em taxonomia de rizóbios, os genes *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB* têm sido, frequentemente, relatados como marcadores moleculares alternativos para análise de sequências concatenadas na classificação de novas taxa (DELAMUTA et al., 2015, 2016; HELENE et al., 2017) ou na reclassificação (GAUNT et al., 2001; RAMÍREZ-BABENA et al., 2008; DELAMUTA et al., 2013; MOUSAVI et al., 2015). Atualmente, pelo menos três genes *housekeeping* são comumente analisados por MLSA em inferências filogenéticas de espécies de rizóbios (VELÁZQUEZ et al., 2017). Durán et al. (2014) sugerem o valor de 97 % de similaridade em cinco genes concatenados para a diferenciação de espécies de *Bradyrhizobium*.

Outros marcadores alternativos podem complementar o estudo, como a análise da sequência do espaço intergênico transcrito (ITS) entre os genes 23S RNAr e 16S RNAr. Pelo fato de apresentarem menor grau de conservação quando comparados com o gene 16S RNAr, a filogenia do ITS tem sido incluída em taxonomia de *Bradyrhizobium* por possibilitar maior poder de resolução (VANBERKUM; FUHRMANN, 2000; WILLEMS et al., 2001; MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009). Willems et al. (2003) demonstraram que estirpes com uma similaridade de 95.5 % na sequência de ITS apresentavam 60 % de HDD, correspondendo então as mesmas genoespécies.

Embora os genes simbióticos não sejam úteis para o delineamento de espécies, por estarem localizados em regiões de genoma acessório, alguns genes simbióticos, mais comumente *nodC* e *nifH* são incluídos em estudos de taxonomia de rizóbios. De modo geral, são encontrados em plasmídeos nos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Paraburkholderia* em algumas espécies de *Mesorhizobium*, enquanto que em *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium loti* estão localizados em ilhas simbióticas cromossômicas (BLACK et al., 2012; DE MEYER et al., 2016; OKUBO et al., 2016). A partir disso, eventos naturais de

transferência horizontal e duplicação de genes contribuem para a evolução e disseminação da capacidade simbiótica entre os grupos bacterianos, o que possivelmente resultou na grande variabilidade encontrada na simbiose rizóbio-leguminosa (MENNA, HUNGRIA, 2011; ROGEL, ORMEÑO-ORRILLO, MARTINEZ-ROMERO, 2011). Definem-se simbiovares como variedades simbióticas, isto é, linhagens, dentro da mesma espécie ou não, capazes de estabelecer simbiose com leguminosas específicas, podendo ser diferenciadas pela faixa de hospedeiros e suportadas por filogenia de genes simbióticos (ROGEL, ORMEÑO-ORRILLO, MARTINEZ-ROMERO, 2011; VELÁZQUEZ et al., 2017; DE LAJUDIE et al., 2019). Como exemplo, Delamuta et al. (2017) realizaram a filogenia dos genes simbióticos *nodC*, *nodY*, *nodK* e *nifH* para propor dois simbiovares isolados de leguminosas de importância econômica e ambiental, sendo eles denominados de sojae e pachyrhizi, dentro do gênero *Bradyrhizobium*.

### 3.5.2 Técnicas genotípicas

Quando as estirpes em estudo persistem com uma taxonomia indefinida, faz-se necessário analisar detalhadamente características genotípicas do grupo, a fim de estabelecer um consenso entre todas as informações. Além de analisar as diferenças entre grupos bacterianos, é recomendado um estudo da variabilidade individual capaz de revelar se as estirpes potencialmente pertencentes à nova espécie não são clones (TINDALL et al., 2010). Para tanto, as principais técnicas aplicadas são fundamentadas na presença/ausência de sítios de restrição (polimorfismo de sítios de restrição) ou homologia de iniciadores curtos. A análise se dá basicamente por eletroforese, a qual fornece um padrão individual de bandas, sendo analogamente definida como a impressão digital de DNA. Por conta disso, essas técnicas são conhecidas como *fingerprinting* de DNA (MOORE et al., 2010; FAKRUDDIN et al., 2013).

Em taxonomia de procariotos, uma das técnicas frequentemente empregada é a *Repetitive Sequence-Based PCR* (rep-PCR), que consiste na amplificação de sequências repetitivas e conservadas dispersas no genoma bacteriano, as quais têm se mostrado adequadas para uma variedade de grupos bacterianos, inclusive rizóbios (VERSALOVIC et al., 1991; DE BRUIJN, 1992). Embora estáveis ao longo das gerações, essas sequências repetitivas são suscetíveis a mudanças originadas por polimorfismos, inserções de profagos, perda ou rearranjo de plasmídeos indígenas, recombinação entre sequências repetidas ou introgressão de DNA genômico via transferência horizontal. Sendo assim, a técnica rep-PCR

tem sido essencial para estudos de evolução e plasticidade dos genomas microbianos (ISHII; SADOWSKY, 2009).

Os três principais conjuntos de elementos repetitivos consistem em REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (STERN et al., 1984), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (HULTON et al., 1991) e BOX (MARTIN et al., 1992), sendo este último subdividido em boxA, boxB e boxC, dentre os quais, a subunidade boxA é a mais conservada, apresentando 54 pb e 25 repetições no genoma, tornando-a, portanto, a mais utilizada (VERSALOVIC et al., 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995). Tais elementos estão dispersos em ambas as orientações do genoma, permitindo a amplificação por um único *primer* (BOX-A1R), o que reduz o custo do método, além de se destacar pela relativa rapidez e facilidade do processo, sendo útil na triagem de grandes números de isolados (HUNGRIA et al., 2008; MENNA et al., 2009).

Por um longo período nas últimas décadas, a técnica de HDD foi utilizada como “padrão ouro” na taxonomia de procariotos. Sendo assim, duas estirpes eram consideradas pertencentes à mesma espécie, quando os valores de similaridade HDD eram superiores a 70 %, ou inferiores a 5 °C  $\Delta T_m$  (diferença na temperatura de desnaturação da fita homóloga e heteróloga) (VANDAMME et al., 1996; ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2001; ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2015). No entanto, atualmente, esta técnica tem sido considerada obsoleta, principalmente por requerer instalações laboratoriais específicas, contempladas em poucos laboratórios no mundo. Além disso, não é possível o desenvolvimento de bancos de dados para armazenamento e comparações das informações geradas, dificultando a reprodutibilidade dos resultados. Essa técnica também é criticada por ser relativamente demorada, custosa e excluir organismos não cultiváveis (CHUN; RAINEY, 2014; RAMASAMY et al., 2014; MAHATO et al., 2017).

Com o rápido progresso das tecnologias de sequenciamento (*next-generation sequencing* – NGS), a substituição da técnica de HDD por técnicas que calculam índices de similaridade entre sequências genômicas *in silico* (*overall genome relatedness index* – OGRI), tais como *Average Nucleotide Identity* (ANI) e HDD digital, têm se mostrado promissoras devido à viabilidade dos custos, qualidade das informações geradas e facilidade de reprodução, uma vez que as sequências genômicas podem ser depositadas em bancos de dados e considerada uma ferramenta inestimável para substituir o HDD convencional (CHUN; RAINEY, 2014; MEIER-KOLTHOFF; KLENK; GÖKER, 2014).

Para o sequenciamento de genomas procarióticos, uma plataforma comumente utilizada hoje é o MiSeq da Illumina, a qual tem se mostrado vantajosa economicamente, relativamente rápida e capaz de gerar dados de qualidade (QUAIL et al., 2012). Inicialmente, o DNA é submetido à construção de uma biblioteca genômica, onde adaptadores específicos são adicionados nas extremidades das fitas fragmentadas. Em seguida, os fragmentos são incorporados na célula de fluxo (*flow cell*), uma fina lâmina de vidro contendo oito dispositivos e uma densa quantidade de adaptadores complementares. Com auxílio da DNA polimerase, as fitas são submetidas à amplificação em ponte, resultando em múltiplas cópias do mesmo fragmento inicial de DNA denominados *clusters*, os quais são sequenciados pela abordagem de sequenciamento por síntese (BENTLEY et al., 2008; MARDIS, 2008; SLATKO; GARDNER e AUSUBEL, 2018).

Após obtida uma sequência genômica, esta é comparada com outra, a fim de determinar o valor de ANI, o qual é representado por uma média de valores de identidade entre múltiplos conjuntos de regiões ortólogas compartilhadas por dois genomas. Konstantinidis e Tiedje (2005) mostraram, pela primeira vez, que o ANI de genes compartilhados entre dois genomas é uma medida robusta de distância evolutiva, já que tais valores correspondem aos valores de HDD. Pouco tempo depois, Goris et al. (2007) aprimoraram a análise de ANI, utilizando 28 estirpes pertencentes a seis diferentes grupos bacterianos, nas quais o genoma estava disponível, o que resultou num total de 124 valores de HDD. Em seguida, os autores cortaram as sequências genômicas em fragmentos correspondentes ao tamanho de fragmento de DNA utilizado na HDD. Combinações de sequências alinhadas pelo BLASTN foram selecionadas para realizar o ANI. Os resultados revelaram uma estreita relação entre os valores de HDD, ANI e a porcentagem de DNA conservado para cada par de estirpe. O valor de corte recomendado de 70 % de HDD para delineamento de espécies correspondeu a 95-96 % de ANI e 69 % de DNA conservado. Atualmente, a técnica de ANI é amplamente utilizada em taxonomia de procariotos. O cálculo de similaridade entre os genomas é realizado por softwares que utilizam algoritmos para determinar valores precisos da similaridade entre dois genomas; exemplos de softwares utilizados para estes fins são o JSpecies (RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009) e o ANI *calculator* (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2016). Outra técnica comumente aplicada se dá por HDDd, sendo analisada pelo valor de corte de 70 % no delineamento de espécies (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

Quando disponíveis, as sequências genômicas ainda podem fornecer a porcentagem do conteúdo de G + C, um parâmetro útil para demonstrar a relação de bases (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2001; TINDALL et al., 2010). Meier-Kolthoff; Klenk; Göker (2014) reavaliaram os valores de conteúdo de G + C dentro de espécies comparando dados genômicos e HDDd, indicando que os valores não variam mais do que 1 % dentro da mesma espécie. O QUAST é uma ferramenta usual na determinação do conteúdo G + C a partir de montagens genômicas (GUREVICH et al., 2013). Além disso, diversos parâmetros estatísticos devem ser incluídos na publicação a fim de demonstrar a qualidade da sequência genômica para taxonomia, tais como: tamanho do genoma; número de contigs; N50, dado por um valor referente ao número de pares de bases do contig que represente 50 % do genoma e, profundidade/cobertura do genoma, isto é, quantas vezes determinado genoma foi sequenciado, sugere-se valores  $\geq 50$  x/folds (CHUN et al., 2018).

### **3.5.3 Técnicas fenotípicas**

Técnicas fenotípicas clássicas na taxonomia de procariotos incluem a análise de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Individualmente, muitas dessas informações parecem ser irrelevantes para o delineamento de parentesco genético, no entanto, quando somadas, fornecem informações descritivas que permitem o reconhecimento de táxons. Geralmente são os primeiros testes a serem empregados, sendo úteis para as descrições iniciais e a definição das análises subsequentes e mais definitivas. Características morfológicas de bactérias incluem aspectos celulares, tais como: forma, presença de endósporos, flagelos, corpos de inclusão, coloração de Gram e aspectos das colônias, tais como: coloração, dimensões, forma, elevação, textura, opacidade, aparência das margens e produção de muco. Já as características fisiológicas e bioquímicas incluem dados sobre diferentes condições de crescimento, como variação na temperatura, no pH, concentrações de sal, requerimento de O<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>, resistência a antibióticos, atividade enzimática e metabolização de compostos (VANDAMME et al., 1996; MOORE et al., 2010). Recomenda-se a análise conjunta de estirpes tipo intimamente relacionadas e a inclusão de controles positivos e negativos (TINDALL et al., 2010).

Uma das principais limitações da caracterização fenotípica consiste no fato de que o fenótipo é resultado do genótipo e ambiente, sendo assim, as condições laboratoriais diferem da natureza, o que torna impossível conhecer todo o fenótipo apenas por características observáveis. Outro fator é a falta de concordância entre os dados, visto que os

protocolos podem variar entre laboratórios (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2001). Para tanto, Tindall et al. (2010) enfatizam o uso de testes comerciais, como API (bioMérieux) ou placas de Biolog (Biolog Inc.), os quais podem ser documentados na literatura original ou em padrões mínimos.

Outro importante aspecto a ser analisado é quanto à caracterização química da célula, a qual envolve vários elementos estruturais, como as camadas celulares externas de peptidoglicano, ácidos tecóicos, ácidos micólicos, a membrana celular e a composição dos ácidos graxos, lipídios polares, lipoquinonas respiratórias, pigmentos ou, ainda, constituintes do citoplasma, como as poliaminas (TINDALL et al., 2010). Tais características podem ser chamadas de marcadores quimiotaxonômicos, pois normalmente são propriedades estáveis e previsíveis em cada grupo bacteriano, gerando informações úteis para taxonomia e diversidade (KÄMPFER, 2014). Dentre tais marcadores, a determinação do perfil de ácidos graxos tem sido usual em estudos de taxonomia. Para tanto, o sistema *Sherlock Microbial Identification System* (MIDI Inc.) fornece um banco de dados abrangente para este tipo de análise (TINDALL et al., 2010).

### **3.6 Descrição de novas espécies bacterianas**

A unidade básica de diversidade biológica é a espécie. O conceito de espécie é considerado uma estrutura teórica universal, capaz de explicar os limites da categoria ‘espécie’ para todos os organismos vivos. Em relação aos procariotos, várias incompatibilidades de interpretação são discutidas, visto que tais organismos não se enquadram nos mais recorrentes conceitos de espécie utilizados para eucariotos, como o conceito morfológico, biológico ou evolutivo (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2001). Desta forma, o conceito de espécie procariótica se refere a uma categoria que delimita uma coerência monofilética, genotípica e fenotípica entre um grupo de organismos, o qual pode ser claramente discriminado de outros grupos por meio de parâmetros padronizados (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2015).

A descrição de novas espécies bacterianas segue as diretrizes propostas pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (ICSP), as quais recomendam a utilização da abordagem polifásica para uma sólida classificação de microrganismos. Recomenda-se a descrição de pelo menos duas estirpes, dentre as quais, uma estirpe deverá ser determinada como a estirpe de referência do grupo (estirpe tipo) e depositada em duas coleções de culturas

internacionais diferentes (STACKEBRANDT et al., 2002; TINDALL et al., 2010; KÄMPFER; GLAESER, 2012). Apesar do conjunto de metodologias padronizadas referentes a uma caracterização fenotípica, genotípica e filogenética de estirpes ainda ser amplamente utilizada na taxonomia de microrganismos, a repercussão das NGS tem motivado uma classificação baseada em sequências genômicas, o que pode revolucionar o atual conceito de espécie para procariotos (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2015; CHUN et al., 2018). Portanto, o que define uma espécie bacteriana está totalmente relacionado com o avanço tecnológico das metodologias, não podendo considerar que o conceito de espécie procariótico é absoluto.

Atualmente recomenda-se a obtenção da sequência completa de 16S RNAr a partir do genoma completo da estirpe em estudo, a qual deverá ser comparada com a sequência obtida pela técnica de sequenciamento de Sanger e alinhada com sequências de estirpes do gênero estudado disponíveis em bancos de dados, a fim de encontrar as espécies mais próximas. Caso a similaridade dessas sequências for menor que o valor de corte de 16S para o delineamento de espécies (>98.7%), é designada como uma nova espécie. Se o valor for maior ou igual, é necessário realizar cálculos de OGRI com base nas sequências genômicas depositadas em bancos de dados (CHUN et al., 2018).

A inclusão de dados genômicos é altamente recomendada, entretanto, caso os autores não puderem fornecer tais dados por qualquer motivo, deve ser declarado na submissão do artigo, sendo julgada pelo editor responsável. A estirpe tipo deverá ser destacada no artigo de publicação, podendo ser realizada através do *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) ou via publicação em periódicos que incluam informações das estirpes na lista de validação de espécies bacterianas (STACKEBRANDT et al., 2002; TINDALL et al., 2010; KÄMPFER; GLAESER, 2012; DE LAJUDIE et al., 2019; TRUJILLO, 2019).

Além de seguir todas essas diretrizes, em taxonomia de rizóbios recomenda-se a avaliação da capacidade simbiótica e a determinação de simbiovares. A fim de verificar a nodulação e eficiência de fixação de nitrogênio, são realizados experimentos com base no postulado de Koch e testes em diferentes espécies de leguminosas. Esta última alternativa é utilizada para demonstrar a faixa hospedeira das estirpes e a determinação de simbiovares, ou quando a espécie hospedeira original apresenta sementes de difícil acesso ou germinação. As espécies *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, *Vigna unguiculata* e *Mimosa*

*pudica* são leguminosas promíscuas comumente utilizadas em estudos com rizóbios pertencentes à alfa e beta-proteobacteria. Tais características podem ser verificadas pela presença/ausência de nódulos, aparência, biomassa de planta ou conteúdo de N, ensaio de redução de acetileno, em comparação com controles não inoculados. A caracterização simbiótica das estirpes também deve ser suportada por meio da filogenia dos genes simbióticos (DELAMUTA et al., 2015; HUNGRIA et al., 2016; DE LAJUDIE et al., 2019).

### **3.7 Taxonomia de rizóbios e o gênero *Bradyrhizobium***

Inicialmente, um único gênero denominado *Rhizobium* foi descrito, contendo seis espécies, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum*, as quais foram classificadas de acordo com o conceito de inoculação cruzada proposto por Baldwin e Fred (1929), onde os rizóbios eram classificados de acordo com a leguminosa hospedeira (ZAKHIA; DE LAJUDIE, 2001; WILLEMS, 2006). Por volta de 1960, a taxonomia numérica propiciou elucidar a relação entre *Rhizobium* e *Agrobacterium*, entre outras reclassificações (GRAHAM, 1964). Pouco tempo mais tarde, um novo gênero foi criado, o qual agrupou as estirpes de crescimento lento e que alcalinizavam meio de cultura contendo a fonte de carbono manitol, sendo denominado *Bradyrhizobium* (do grego, *bradus* = lento), onde *R. japonicum* foi reclassificada em *B. japonicum* (JORDAN, 1982).

Como mencionado em tópicos anteriores, à medida que as metodologias avançaram, a classificação de rizóbios também foi enriquecida. Atualmente, os rizóbios estão presentes na classe Alphaproteobacteria, distribuídos nos gêneros *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer* (= *Sinorhizobium*), *Microvirga*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Neorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Pararhizobium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* e *Shinella* (PEIX et al., 2015; SHAMSELDIN; ABDELKHALEK; SADOWSKY, 2017; VELÁZQUEZ et al., 2017; DE LAJUDIE et al., 2019).

Há duas décadas, também foi demonstrado que os rizóbios estão presentes na classe Betaproteobacteria, nos gêneros, *Paraburkholderia* (anteriormente classificado como *Burkholderia*), *Cupriavidus* (anteriormente classificado como *Ralstonia*) e *Trinickia* (CHEN et al., 2001; MOULIN; MUNIUE; DREYFUS, 2001; VANDAMME; COENYE, 2004; SAWANA; ADEOLU; GUPTA, 2014; DE LAJUDIE et al., 2019). Menos usual e

ainda um tanto controverso, Shiraishi; Matsushita e Hougetsu (2010) relataram a habilidade nodulífera de representantes de *Pseudomonas* sp., pertencentes à classe Gamaproteobacteria.

Dentre os clados de rizóbio citados acima, um grupo bastante heterogêneo compreende o gênero *Bradyrhizobium*, o qual é predominante em populações rizobianas de solos tropicais. Por muito tempo, o gênero incluiu apenas a espécie *B. japonicum*, onde todas as estirpes nodulíferas de soja foram alocadas, sendo as demais estirpes denominadas apenas como *Bradyrhizobium* sp. Entretanto, ainda quando esta espécie era classificada no gênero *Rhizobium*, Hollis; Kloos e Elkan (1981) demonstraram a heterogeneidade do grupo por meio de HDD, separando-o em I, Ia e II, onde os dois primeiros eram mais relacionados entre si quando comparado ao terceiro. Quase dez anos depois, evidências moleculares suportaram a reclassificação do subgrupo II em uma nova espécie, denominada *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992). A partir disso, baseado na filogenia do gene 16S, é amplamente aceito que as espécies de *Bradyrhizobium* são separadas em dois superclados bem suportados: *B. japonicum* e *B. elkanii* (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009). Mais recentemente, baseados em extensas evidências filogenéticas, genotípicas e fenotípicas, Delamuta et al. (2013) propuseram a reclassificação do grupo Ia de *B. japonicum* para a espécie *B. diazoefficiens*, dentre as quais, as estirpes CPAC7 e USDA 110 incluídas no estudo, são largamente utilizadas como inoculante comercial para soja no Brasil e no mundo.

Nesta última década, um número crescente de publicações tem relatado a diversidade genética de *Bradyrhizobium*. De acordo com “*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*”, o gênero contém hoje 39 espécies descritas (LPSN, 2019), no entanto, o gênero contém 53 espécies, sendo que muitas não constam na lista. Em relação aos aspectos ecológicos, o gênero tem exibido uma larga faixa de hospedeiros, variando desde leguminosas de importância econômica como a soja (MENNA et al., 2009), até leguminosas basais de Caesalpinioideae. A propósito, estirpes de *Bradyrhizobium* têm sido recorrentemente isoladas de tais leguminosas, sendo considerado o microssimbionte preferido desta subfamília (FONSECA et al., 2012; YAO et al., 2015; ANDREWS; ANDREWS, 2017; DOS SANTOS et al., 2017). Com base nisso, sugere-se que o gênero *Bradyrhizobium* é o simbionte primordial de Fabaceae (FONSECA et al., 2012; PARKER, 2015; DOS SANTOS et al., 2017).

O grupo inclui estirpes capazes de nodular *Parasponia andersonii* uma não leguminosa da família Cannabaceae (TRINICK; GALBRAITH, 1980) e *B. betae* isolada de

deformações semelhantes a tumores nas raízes de beterraba (RIVAS et al., 2004). Vale ressaltar que este é o único gênero entre rizóbios que preservou a capacidade fotossintética. As estirpes fotossintéticas do gênero se associam unicamente com plantas tropicais do gênero *Aeschynomene* e normalmente estão relacionadas com a ausência de genes de nodulação (GIRAUD et al., 2007; MICHÉ et al., 2010; BONALDI et al., 2011). Juntamente com *Azorhizobium*, o gênero também é o único capaz de fixar nitrogênio tanto livremente no solo, como em associações simbióticas (HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015). Além das características ambientais, estudos revelaram o isolamento de estirpes de *Bradyrhizobium* em pacientes enfermos, sugerindo que tais estirpes podem ser patógenos oportunistas humanos (BHATT et al., 2013; LO et al., 2013).

Apesar da diversidade encontrada no gênero *Bradyrhizobium*, estima-se que grande parte das espécies permanece desconhecida. Intensificar os estudos sobre a taxonomia desse grupo tem a possibilidade de gerar maiores compreensões sobre especificidade hospedeira, visto que esse grupo apresenta uma ampla faixa e, portanto, pode vir a se tornar uma importante ferramenta para a recuperação de áreas degradadas, podendo subsidiar diferentes tipos de solos e biomassa. Além disso, pela possibilidade de algumas estirpes estabelecerem relações simbióticas com leguminosas de importância econômica, podem futuramente resultar em aplicações biotecnológicas interessantes.

#### 4. Metodologia

A metodologia utilizada visou a caracterização de estirpes isoladas de *Chamaecrista fasciculata* nativa dos Estados Unidos da América. Para tanto, estirpes isoladas dessa leguminosa foram avaliadas quanto aos aspectos morfofisiológicos, genotípicos e filogenéticos no Laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa Soja, em Londrina, PR. A análise do perfil de ácidos graxos referente à caracterização química dos isolados foi realizada na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna, SP. A caracterização das estirpes seguindo uma abordagem polifásica foi procedida tanto para as estirpes em estudo, quanto para algumas espécies do gênero.

##### 4.1 Amostragem dos nódulos radiculares

As três estirpes em estudo foram isoladas de nódulos radiculares de *Chamaecrista fasciculata*, uma leguminosa anual, nativa do leste, centro-oeste e sul dos Estados Unidos (MORRIS, 2012). As plantas foram coletadas em três pontos diferentes ao longo da Rodovia Interestadual 29, que conecta os estados de Missouri (MO) e Nebraska (NE). A cidade de Kansas (localizada em MO) foi utilizada como referência para demonstrar a localização e a distância entre os pontos de amostragem das plantas contendo nódulos. Sendo assim, a estirpe identificada como CNPSo 3394 foi isolada na estrada de Riverside, localizada na cidade de Saint Joseph (em MO), a 89 km de Kansas; já a estirpe correspondente à CNPSo 3442, teve como ponto de coleta a cidade de Camden Point (em MO), localizada a 54 km de distância de Kansas; enquanto que a terceira estirpe, denominada CNPSo 3448 foi coletada em Savannah (em MO), cidade com cerca de 106 km da referência. As coordenadas geográficas estão indicadas na Tabela 1. Nos locais de amostragem, as plantas foram cuidadosamente retiradas do solo para obter o sistema radicular contendo nódulos, os quais foram separados da parte aérea e acondicionados em sacos plásticos com as devidas identificações. O isolamento dos rizóbios foi realizado pelo Dr. Padma Somasegaran e colaboradores em Saint Joseph, Missouri (USA).

**Tabela 1.** Identificação das estirpes.

Estirpes	Outras identificações	Leguminosa hospedeira	Coordenada geográfica
<i>B. niftali</i> CNPSo 3448 <sup>T</sup>	USDA 10051 <sup>T</sup> , U687 <sup>T</sup> , CL 40 <sup>T</sup>	<i>C. fasciculata</i>	Savannah - MO (USA), 106 km de Kansas City, 39.94668° N, -94.83081° E
<i>B. niftali</i> CNPSo 3394	CL01	<i>C. fasciculata</i>	Saint Joseph – MO (USA), 89 km de Kansas City, 39.7666° N, -94.85607° E
<i>B. niftali</i> CNPSo 3442	CL22	<i>C. fasciculata</i>	Camden Point – MO (USA), 54 km de Kansas City, 39.4535° N, -94.74256° E

#### **4.2 Desinfestação dos nódulos e isolamento de rizóbios**

As amostras foram mantidas a 4 °C por 2 a 3 dias até o isolamento dos rizóbios. As raízes foram então lavadas para retirar o excesso de solo. Cerca de 10 a 15 nódulos foram retirados das raízes e transferidos para uma solução de Tween 80 a 0,1%, por cerca de 5-10 minutos. A superfície do nódulo foi desinfestada em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3 % por aproximadamente 3-5 minutos. Em seguida, foram realizadas lavagens com água destilada estéril e transferidos para um tubo contendo 0,5 mL de água destilada estéril. Os nódulos foram então macerados com auxílio de um bastão de vidro, resultando em uma suspensão de rizóbios, a qual foi inoculada em meio de cultura *Yeast Mannitol Agar* (YMA) contendo vermelho Congo e indicador de pH azul de bromotimol, de acordo com Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1994).

As estirpes foram enviadas para o Brasil e depositadas na “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” (Coleção WFCC #1213; WDCM #1054), recebendo o número de acesso CNPSo. Culturas puras de todas as estirpes foram estocadas por liofilização e criopreservadas em YM líquido contendo glicerol 30% (v/v) à -80 °C e -150 °C, garantindo a viabilidade das estirpes por longos períodos e mantidas em placas de Petri contendo YMA modificado (HUNGRIA et al., 2016) à -4 °C como estoque a curto prazo (DELAMUTA et al., 2016). Além disso, as estirpes foram depositadas em outras coleções de culturas internacionais associadas com a *World Federation Culture Collection* (WFCC), sendo elas: *United States Department of Agriculture* (coleção USDA) e *Instituto Nacional de Investigación Agropecuária* (coleção U).

#### **4.3 Caracterização morfológica das colônias**

As colônias foram caracterizadas conforme descrito por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1994), salvo algumas adaptações, em relação aos seus aspectos morfológicos em YMA modificado contendo vermelho Congo, onde foram analisadas: manifestação de crescimento, diâmetro da colônia, alteração do pH em YMA contendo indicador azul de bromotimol, forma da colônia, elevação da colônia, borda da colônia, superfície da colônia, produção de muco, consistência da massa de crescimento, detalhes ópticos e cromogênese da colônia em YMA contendo azul de bromotimol e vermelho Congo.

Todos os testes foram realizados mediante incubação a 28 °C, exceto testes de variação de temperatura.

#### **4.3.1 Manifestação de crescimento**

As estirpes semeadas em meio YMA contendo vermelho Congo foram avaliadas quanto à manifestação de crescimento mediante o crescimento de, no mínimo, três colônias isoladas, as quais foram classificadas como: rápida (até 3 dias), intermediária (4 a 5 dias), lenta (6 a 9 dias) ou muito lenta (acima a 10 dias).

#### **4.3.2 Diâmetro das colônias**

As colônias foram analisadas quanto ao seu diâmetro, com o auxílio de um paquímetro e um estereomicroscópio, sendo realizada a média do diâmetro em milímetros de três colônias isoladas.

#### **4.3.3 Alteração do pH do meio**

As estirpes foram crescidas em YMA modificado contendo o indicador azul de bromotimol. À medida que colônias isoladas manifestaram crescimento, foram analisadas quanto: reação ácida (coloração do meio alterada para amarelo), reação alcalina (coloração do meio alterada para azul) e neutra (coloração do meio se manteve verde).

#### **4.3.4 Forma, borda, superfície e elevação das colônias**

As colônias isoladas foram observadas em estereomicroscópio e avaliadas quanto a sua forma: circular, oval (elíptica) ou irregular; borda: lisa, ondulada ou filamentosa; superfície: lisa ou rugosa e elevação: plana ou convexa. Esta última análise foi realizada visualizando as placas lateralmente.

#### **4.3.5 Produção de muco**

As colônias foram analisadas quanto à produção de muco através do tamanho da massa de crescimento, sendo classificadas como: pouca ( $\leq 1,9$  mm); moderada (2 a 3,9 mm) e abundante ( $\geq 4$  mm).

#### **4.3.6 Consistência da massa de crescimento**

A consistência da massa de crescimento foi avaliada com auxílio de uma alça de platina previamente flambada e resfriada, a qual foi arrastada sobre uma colônia

isolada, sendo classificadas como: aquosas (totalmente desmanchadas quando tocadas), secas (pouca massa de crescimento), gomosas (arrastadas sobre o meio de cultura sem se desmanchar, deixando um pequeno rastro) e viscosas (aspecto elástico).

#### **4.3.7 Detalhes ópticos**

As colônias foram analisadas quanto aos detalhes ópticos com o auxílio de um risco no fundo da placa atrás das colônias realizado com caneta preta (retroprojektor), sendo classificadas como: translúcidas (se o risco aparece através da massa de consistência) e opaca (se o risco for pouco visível ou totalmente coberto pela massa de consistência).

#### **4.3.8 Cromogênese em YMA contendo azul de bromotimol e vermelho Congo**

As estirpes foram semeadas em YMA modificado contendo azul de bromotimol e avaliadas quanto à coloração das colônias, sendo classificadas como: creme, amarela, rosa ou azul. Da mesma forma, as estirpes foram avaliadas em YMA contendo vermelho Congo, sendo classificadas como: branca, rosada, avermelhada (centro) ou vermelha.

### **4.4 Caracterização fisiológica**

#### **4.4.1 Crescimento em diferentes meios e condições**

As estirpes foram avaliadas quanto à manifestação de crescimento em outros meios de cultura e diferentes condições de crescimento de acordo com Hungria et al. (2001). Para tanto, o crescimento das estirpes foi avaliado em meio Luria Bertani (triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, extrato de Levedura 5 g/L, ágar 15 g/L, pH 7,5), crescimento em condições salinas em YMA modificado com 1 % de NaCl, crescimento em condições de pH distintas, em YMA modificado com pH 4 e pH 9 e em YMA modificado a 37 °C. A manifestação de crescimento das colônias foi acompanhada diariamente e, após sete dias de incubação, os resultados foram analisados em relação à presença (+) ou ausência (-) de crescimento.

#### **4.4.2 Atividade da enzima urease**

As estirpes foram avaliadas quanto à atividade da enzima urease por meio do crescimento em YMA modificado acrescido de 2 % de ureia (contendo o corante vermelho de fenol), sendo classificadas como: positiva, isto é, a estirpe foi capaz de degradar a ureia, com a coloração do meio alterada para rosa; intermediária, significando que a estirpe

apresentou baixa atividade de urease e negativa, onde a estirpe não foi capaz de degradar a ureia, com a coloração do meio permanecendo amarela.

#### **4.4.3 Utilização de Fontes de C**

As estirpes foram avaliadas quanto à utilização de 49 fontes de carbono por meio da plataforma de API 50CH kit (BioMérieux). Para tanto, um pré-inóculo foi crescido em YM líquido e, após atingir o crescimento adequado foi centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi ressuspensão em 5 mL de solução salina 0,85 %. O processo foi repetido nas mesmas condições, no entanto, o pélete foi ressuspensão em 2 mL de água ultrapura ou destilada estéril. Em um tubo contendo 5 mL de água estéril, a concentração de células foi ajustada com o auxílio de um conta gotas para a escala 3 de McFarland ( $10^9$  células mL<sup>-1</sup>). Em seguida, foi adicionado ao meio YM líquido modificado contendo azul de bromotimol 0,5 % (sem manitol; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/L; NaCl 0,1 g/L; extrato de levedura 0,3 g/L). A plataforma do kit 50CH foi hidratada com água e as placas contendo as fontes de C foram organizadas em ordem crescente. A seguir, 230 µL do inóculo preparado foram aplicados em cada fonte. As condições anaeróbicas para que as estirpes possam realizar fermentação a partir das fontes de carbono ocorreram mediante adição de cerca de 3 gotas de vaselina em cada poço. A plataforma foi incubada a 28 °C em B.O.D por 7 dias. O teste foi realizado em duplicata para cada estirpe.

Para rizóbios de crescimento lento, os resultados foram coletados aos cinco e sete dias, sendo avaliados quanto à intensidade da coloração, independente da alteração para amarelo ou azul, sendo classificadas como: positivo, isto é, a estirpe foi capaz de metabolizar determinada fonte de C, se a coloração for intensa; intermediário, significando que a estirpe foi capaz de metabolizar moderadamente a fonte de C, se a coloração for alterada levemente e negativo, significando que a estirpe não foi capaz de metabolizar a fonte de C, se não for observada alteração na coloração.

#### **4.4.4 Tolerância a antibióticos**

As estirpes foram testadas quanto à tolerância aos antibióticos bacitracina (0,04 U/disco), ampicilina (10 µg/mL), neomicina (30 µg/mL), estreptomicina (10 µg/mL), tetraciclina (30 µg/mL), eritromicina (15 µg/mL), cefuroxima (30 µg/mL), cloranfenicol (30 µg/mL), penicilina (10 U/disco) e ácido nalidíxico (30 µg/mL). As estirpes foram crescidas em YM líquido durante sete dias, sob agitação constante de 100 rpm. Após atingir o

crescimento, as estirpes foram avaliadas quanto à tolerância aos antibióticos pelo método de disco-difusão proposto por Bauer et al. (1966). Para tanto, as suspensões das estirpes foram semeadas pela técnica de espalhamento, com auxílio de uma alça de Drigalski em meio YMA modificado. Em seguida, dois discos do mesmo antibiótico foram adicionados em uma distância de pelo menos 2 cm da borda da placa e pelo menos 3 cm um do outro.

O halo de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro e interpretado com base em Bauer et al. (1966), que propuseram a classificação de sensível, moderadamente resistente e resistente de acordo com o diâmetro do halo, os quais variam de acordo com a concentração e o tipo do antibiótico.

## **4.5 Caracterização química**

### **4.5.1 Perfil de ácidos graxos**

A estirpe tipo do grupo em estudo e as estirpes tipo mais próximas foram caracterizadas quanto ao perfil de ácidos graxos. Essas análises foram realizadas em parceria com a Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, São Paulo. As estirpes foram crescidas em meio de cultura YMA modificado contendo vermelho Congo por sete dias a 28 °C. Após isso, foram enviadas para a análise, conforme descrito por Delamuta et al. (2013). Os perfis foram determinados usando o MIDI, *Sherlock Microbial Identification System* (SASSER, 1990), com o banco de dados TSBA6.

## **4.6 Caracterização filogenética e genotípica**

### **4.6.1 Extração de DNA**

As estirpes foram crescidas em 10 mL de YM líquido sob agitação de 100 rpm a 28 °C, durante sete dias. A extração de DNA de 1 mL do inóculo das três estirpes foi realizada utilizando-se o kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen, Hilden, Germany), conforme as instruções do fabricante. Para verificar a integridade e concentração do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. A partir disso, as amostras foram concentradas ou diluídas, a fim de igualar a concentração. Os DNAs foram armazenados em microtubos de 1,5 mL a -20 °C e utilizados para várias metodologias descritas a seguir.

### **4.6.2 BOX-PCR**

As estirpes foram avaliadas quanto à variabilidade individual por meio de amplificação da região boxA distribuída pelo genoma. A reação apresenta volume final de 25

$\mu\text{L}$ , consistindo em: 13,8  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q estéril; 5,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs, (estoque com 1,5 mmol/L de cada desoxirribonucleotídeo); 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , (50 mmol  $\text{L}^{-1}$ ); 1,0  $\mu\text{L}$  do iniciador BOX-AIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (50 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (VERSALOVIC et al., 1994); 1,0  $\mu\text{L}$  de DNA (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (HUNGRIA et al., 2008).

As reações ocorreram em um termociclador ProFlex PCR System da Applied Biosystems, com uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 7 min; 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 1 min a 53 °C (hibridização) e 8 min a 65 °C (extensão); etapa final de extensão a 65 °C por 16 min e manutenção a 4 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose de 24,5 x 20,5 cm a 1,5% por 5 horas e o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,00005 %.

Os perfis genéticos foram analisados no software Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.6), por meio da construção de um dendrograma de similaridade, utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) (SNEATH; SOKAL, 1973) para a comparação do agrupamento e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 3 % de tolerância.

#### 4.6.3 Amplificação por PCR

Todas as estirpes foram submetidas à amplificação dos genes 16S RNAr, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *nodC* e *nifH* e do espaço intergênico transcrito (ITS). Para os genes 16S RNAr, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*, a reação consistiu em 5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X (Tris- base a 200 mM, pH 8,4, KCl a 500 mM), 3  $\mu\text{L}$  de dNTPs (1,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo), 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM), 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima Taq DNA polimerase (1U), 1,5  $\mu\text{L}$  dos iniciadores específicos para cada região amplificada (10 pmol/reação), 2  $\mu\text{L}$  de DNA (de 10 a 20 ng/ $\mu\text{L}$ ) e 35,3  $\mu\text{L}$  de água ultrapura esterilizada até completar o volume final de 50  $\mu\text{L}$ . As concentrações dos reagentes foram as mesmas para todos os genes. Já para o gene *nodC* a reação consistiu em 5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X, 6,6  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 2,4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,3  $\mu\text{L}$  da enzima Taq DNA polimerase, 2  $\mu\text{L}$  dos iniciadores, 2  $\mu\text{L}$  de DNA e 29,7  $\mu\text{L}$  de água ultrapura esterilizada alcançando o volume final de 50  $\mu\text{L}$ . A amplificação do gene *nifH* seguiu a seguinte reação: 5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X, 3  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima Taq DNA polimerase, 1  $\mu\text{L}$  dos iniciadores, 1,5  $\mu\text{L}$  de DNA e 36,8  $\mu\text{L}$  de água ultrapura esterilizada completando o volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Enquanto que a reação do espaço

intergênico transcrito (ITS) se deu por: 5 µL de tampão 10X, 3 µL de dNTPs, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µL da enzima Taq DNA polimerase, 1,5 µL dos iniciadores, 1,5 µL de DNA e 35,75 µL de água ultrapura esterilizada até atingir o volume final de 50 µL.

Os *primers* e as condições de amplificação de cada gene constam na Tabela 2. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação do tamanho da banda e verificação de bandas inespecíficas. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com auxílio do kit PureLink (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante e novamente submetidos à eletroforese, para confirmação do processo.

**Tabela 2.** *Primers* e condições de amplificação dos genes 16S RNAr, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *nodC* e *nifH* e espaço intergênico transcrito (ITS).

<i>Primer</i>	Sequência	Gene alvo	Condições do ciclo	Referência
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S RNAr	2 min 95 °C, 30 X (15s 94 °C, 45s 93 °C, 45s 55 °C), 2 min 72 °C e 5 min 72 °C)	(WEISBURG et al., 1991)
rD1	CTTAAGGAGGTGATCCAGCC			
TSglnII <sub>f</sub>	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	<i>glnII</i>	2 min 95°C, 35 X (45s 95 °C, 30s 58 °C), 1.5 min 72 °C e 7 min 72 °C	(STEPKOWSKI et al., 2005)
TSglnII <sub>r</sub>	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG			
gyrB343F	TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG	<i>gyrB</i>	5 min 95 °C, 5X (2 min 94 °C, 2 min 58 °C, 1 min 72°C) 28 X (30 s 94 °C, 1 min 58 °C, 1 min 72 °C e 5 min 7 2°C)	(MARTENS et al., 2008)
gyrB1043R	AGCTTGTCCTTSGTCTGCG			
TSrecA <sub>f</sub>	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG	<i>recA</i>	2 min 95 °C, 35 X (45s 95 °C, 30s 58 °C), 1.5 min 72 °C e 7 min 72 °C	(STEPKOWSKI et al., 2005)
TSrecA <sub>r</sub>	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG			
rpoB83F	CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC	<i>rpoB</i>	5 min 95 °C, 3X (2 min 94 °C, 2 min 58 °C, 1 min 72°C) 30 X (30s 94 °C, 1 min 58 °C), 1 min 72 °C e 5 min 72 °C	(MARTENS et al., 2008)
rpoB1061R	AGCGTGTTGCGGATATAGGCG			
FGPS 1490	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	ITS	3 min 94 °C, 35X (1 min 94 °C, 1 min 55 °C, 2 min 72 °C e 6 min 72 °C	(LAGUERRE et al., 1996)
FGPS 130	CCGGTTTCCCCATTCGG			

nodCF	GTCGATTGCMRGTC AAGACTACG	<i>nodC</i>	30s 94 °C, 40 X (30s 96 °C, 1 min 53 °C, 30s 72°C), 5 min 72°C	(LAGUERRE et al., 2001)
nodCI	GCCAGGTCTIGTTGCGATTGCTC			
nifHF	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	<i>nifH</i>	2 min 95°C, 35 X (1 min 94°C, 45s 60°C, 2 min 72°C), 7 min 72°C	(LAGUERRE et al., 1996)
nifHI	AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA			

#### 4.6.4 Sequenciamento dos genes

Os produtos de PCR purificados dos genes descritos no tópico anterior foram submetidos a uma nova amplificação, os quais foram purificados de acordo com Menna et al., (2006), salvo algumas adaptações. O sequenciamento foi procedido conforme as condições descritas por Delamuta et al., (2017) no ABI 3500XL (*Applied Biosystems*). A correção das sequências dos diferentes genes e ITS ocorreu manualmente no software *Bionumerics* versão 7.6, tendo como base o alimento com sequências depositadas no banco de dados do *GenBank* por meio da ferramenta BLAST. As sequências em estudo foram depositadas no banco de dados do *GenBank* tendo como número de acesso para os genes 16S RNAr de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK673807), CNPSo 3442 (MK673806), CNPSo 3394 (MK673805); ITS de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK674784), CNPSo 3442 (MK674783), CNPSo 3394 (MK674782); *glnII* de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675791), CNPSo 3442 (MK675790), CNPSo 3394 (MK675789); *recA* de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675797), CNPSo 3442 (MK675796), CNPSo 3394 (MK675795); *rpoB* de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675800), CNPSo 3442 (MK675799), CNPSo 3394 (MK675798); *gyrB* de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675794), CNPSo 3442 (MK675793), CNPSo 3394 (MK675792); *nodC* de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675806), CNPSo 3442 (MK675805), CNPSo 3394 (MK675804); *nifH* de CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675803), CNPSo 3442 (MK675802), CNPSo 3394 (MK675801).

#### 4.6.5 Filogenia dos genes *housekeeping* individuais, 16S RNAr, *nodC*, *nifH* e espaço intergênico transcrito (ITS)

As análises filogenéticas foram procedidas por meio do software MEGA versão 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2013) entre as sequências das estirpes em estudo e sequências de estirpes tipo de todas as espécies de *Bradyrhizobium* disponíveis. Sendo assim, as sequências foram alinhadas por meio do algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e cortadas. A partir do alinhamento, o melhor modelo

de distância evolutiva foi definido pelo MEGA e as árvores filogenéticas foram construídas pelo algoritmo de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*, ML), com valor de *bootstrap* de 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1981). A estirpe *Xanthobacter autotrophicus* Py2 foi utilizada como grupo externo para a construção da árvore do gene 16S RNAr.

#### **4.6.6 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)**

As sequências dos genes *glnI*, *gyrB*, *recA* e *rpoB* foram concatenadas por meio do software *SeaView* (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010) e a árvore filogenética foi construída conforme descrito para os demais genes.

#### **4.6.7 Nucleotide Identity (NI)**

Os valores de NI dos genes *housekeeping* individuais, concatenados, 16S RNAr e do ITS foram determinados por uma matriz de identidade construída com base na similaridade das sequências de todas as estirpes em estudo e das estirpes tipo disponíveis através do programa BioEdit 7.0.4. 1 (HALL, 1999).

#### **4.6.8 Sequenciamento do genoma**

Uma estirpe representativa do grupo determinada a partir das árvores filogenéticas dos genes concatenados e individuais foi selecionada como estirpe tipo do grupo (CNPSo 3448<sup>T</sup>) e para o sequenciamento de genoma. O DNA total foi utilizado para construção de uma biblioteca, utilizando o kit NexteraXT, de acordo com instruções do fabricante, por meio da plataforma MiSeq da Illumina. O genoma foi depositado no *GenBank* sob número de acesso SPQT00000000.

#### **4.6.9 Average Nucleotide Identity (ANI) e hibridização DNA-DNA digital (HDDd)**

Os valores de ANI entre o genoma da estirpe representante do grupo em estudo e os genomas das estirpes tipo mais próximas foram calculados com base na similaridade média dos nucleotídeos por meio do programa online *ANI calculator*, desenvolvido por Rodriguez-R e Konstantinidis (2016). Os valores obtidos foram avaliados quanto ao delineamento de espécies propostos por Goris et al. (2007), enquanto que o valor de HDDd foi determinado pelo Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) version 2.1 com base na fórmula 2 (identities/HSP length) recomendada (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013), utilizando o valor de corte de 70 % de similaridade.

#### 4.6.10 Conteúdo G+C (%)

O conteúdo G+C da sequência genômica da estirpe representante do grupo em estudo foi determinado pelo software Quast (GUREVICH et al., 2013) e também pelo rast (OVERBEEK et al., 2014) e o valor resultante foi comparado com os valores do conteúdo G+C de sequências genômicas relatados em artigos de descrição de espécies já publicados.

#### 4.7 Eficiência de nodulação das estirpes

As estirpes foram avaliadas quanto à eficiência de nodulação nas seguintes espécies de leguminosas: *Chamaecrista fasciculata*, espécie hospedeira na qual as estirpes em estudo foram isoladas, com sementes concedidas pelo Dr. Padma Somasegaran; *Macroptilium antropurpureum*, uma leguminosa da subfamília Papilionoideae, promíscua e popularmente conhecida como siratro e *Glycine max*, variedade BRS 1003. Para tanto, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação de acordo com Hungria et al., (2016): 1) cultivo em sacos de polipropileno e 2) cultivo em vaso de Leonard.

##### 4.7.1 Escarificação

Com o objetivo de quebrar a dormência das sementes e acelerar o processo de crescimento do embrião, as sementes foram escarificadas. Com o auxílio de folhas de lixa, as sementes de *C. fasciculata* foram submetidas a abrasão manual do tegumento por cerca de 2 – 3 minutos ou até o aparecimento do endosperma de coloração branca ou amarelada em ambos os lados da semente, mantendo as laterais com o tegumento intacto, de modo a possibilitar a absorção de água e facilitar a emissão da radícula. Já em *M. antropurpureum*, as sementes foram imergidas em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 5 minutos e lavadas em água destilada 5 vezes, em capela de exaustão. As sementes de *G. max* não necessitam de escarificação.

##### 4.7.2 Desinfestação de sementes

As sementes de *C. fasciculata*; *M. antropurpureum* e *G. max* foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, iniciando-se por 30 segundos em etanol 70 %, seguindo de mais 5 minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) 3 % e, por fim, passaram por 5 lavagens em água destilada estéril.

#### **4.7.3 Crescimento das estirpes utilizadas nos tratamentos**

Os tratamentos foram crescidos em meio YM e incubadas a 28 °C sob agitação, durante 7 dias, até atingir a DO de 0,9. Cinco tratamentos foram inoculados, sendo eles: CNPSo 3394; CNPSo 3442; CNPSo 3448<sup>T</sup>; controle positivo dado pela estirpe SEMIA 5080 conhecida por nodular soja e controle negativo dado por 1 mL de meio YM. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

#### **4.7.4 Cultivo em saco de polipropileno**

Inicialmente, as sementes foram pré-germinadas possibilitando a acomodação nos sacos de polipropileno. Para tanto, após o processo de escarificação e desinfestação, as sementes de *C. fasciculata* foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar-água (1 %) mantendo um espaço entre as sementes, em câmara de fluxo laminar (cerca de 15 sementes por placa). Em seguida, as placas foram incubadas revestidas por papel laminado até a emissão da radícula (cerca de 3 dias) em germinador à 28 °C. Já as sementes de *M. antropurpureum* passaram pelo mesmo processo, não sendo necessário revesti-las com papel laminado. As sementes de *G. max* foram pré-germinadas diretamente em papel germiteste umedecido com água destilada. Três papéis germiteste foram pesados em balança analítica e o peso do papel foi multiplicado por 2,5, resultando no volume de água destilada estéril necessário para umedecer o papel. Em câmara de fluxo laminar, os papéis foram umedecidos em uma bandeja e cerca de 100 sementes foram acomodadas de modo a dar espaço para emissão da radícula. O papel foi dobrado nas laterais, enrolado e amarrado com elásticos. Os rolos foram incubados durante 3 dias em germinador à 28 °C.

Posteriormente, cada saco de polipropileno de 25 x 12 cm contendo 1 folha de papel germiteste embebido em 300 mL de solução nutritiva sem N (0,00036 % Fe-EDTA, 0,0061 % MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,0043 % K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,00016 % MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,014 % CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,0068% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), recebeu uma plântula, a qual foi inoculada com 1 mL de cada tratamento individualmente. Os sacos foram levados para casa de vegetação um dia após a inoculação. O crescimento vegetal foi observado diariamente e a coleta e verificação da eficiência da nodulação foram realizadas 30 dias após a emergência das plantas.

#### **4.7.5 Cultivo em vaso de Leonard**

O crescimento dos tratamentos e a desinfestação das sementes foram realizados como descritos no item anterior. Cada vaso contendo substrato inerte (areia e

carvão triturado 1:1 v/v) autoclavado e solução nutritiva sem N recebeu quatro sementes, onde cada uma foi inoculada por 1 mL de cada tratamento. Cerca de seis dias após o cultivo, as plantas que emergiram foram debastadas, resultando em apenas uma planta por vaso. A coleta e observação da eficiência da nodulação foram realizadas 30 dias após a emergência.

## 5. Referências Bibliográficas

- ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 705, p. 1–39, 2017.
- BALDWIN, I. L.; FRED, E. B. Nomenclature of the root-nodule bacteria of the Leguminosae. **Journal of Bacteriology**, v. 17, n. 2, p. 141, 1929.
- BARNEBY, R. C. A new species of *Chamaecrista* Moench (Caesalpiaceae) from interior Bahia, Brazil. **Brittonia**, v. 46, n. 1, p. 69–71, 1994.
- BARNEBY, R. C. Increments to genus *Chamaecrista* (Caesalpiaceae: *Cassiinae*) from Bolivia and from Atlantic and Planaltine Brazil. **Brittonia**, v. 51, n. 3, p. 331–339, 1999.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1966.
- BENTLEY, D. R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v. 456, p. 53–59, 2008.
- BEYHAUT, E. et al. Legumes in prairie restoration: evidence for wide cross-nodulation and improved inoculant delivery. **Plant and Soil**, v. 377, n. 1/2, p. 245–258, 2014.
- BHATT, M. S. et al. Sequence-based discovery of *Bradyrhizobium enterica* in cord colitis syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 6, p. 517–528, 2013.
- BLACK, M. et al. The genetics of symbiotic nitrogen fixation: Comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. **Genes**, v. 3, n. 1, p. 138–166, 2012.
- BONALDI, K. et al. Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: the *nod*-dependent versus the *nod*-independent symbiotic interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1359–1371, 2011.
- BOOGERD, F. C.; VAN ROSSUM, D. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 5–27, 1997.
- BRILL, W. J. Biological nitrogen fixation. **Scientific American**, v. 273, n. 2, p. 78–83, 1977.
- CAPOEN, W. et al. *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. **New Phytologist**, v. 186, p. 340–345, 2010.
- CASE, R. J. et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 278–288, 2007.
- CHANDLER, M. R. Some observations on infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. **Journal of Experimental Botany**, v. 29, n. 110, p. 749–755, 1978.
- CHANDLER, M. R.; DATE, R. A.; ROUGHLEY, R. J. Infection and root-nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. **Journal of Experimental Botany**, v. 33, n. 132, p. 47–57, 1982.

- CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1729–1735, 2001.
- CHUN, J. et al. 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.
- CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 316–324, 2014.
- CORBRY, H. D. L. Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. **Kirkia**, v. 13, n. 1, p. 53–123, 1988.
- DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (REP and ERIC) sequences and the PCR to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2180–2187, 1992.
- DE BRUIJN, F. J. Biological nitrogen fixation. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). **Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture**. 1. ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 1–448.
- DE FARIA, S. M. et al. New nodulating legume trees from South-East Brazil. **The New Phytologist**, v. 98, p. 317–328, 1984.
- DE FARIA, S. M.; HAY, G. T.; SPRENT, J. I. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 2291–2296, 1988.
- DE FARIA, S. M.; MCINROY, S. G.; SPRENT, I. The occurrence of infected cells, with persistent infection threads, in legume root nodules. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 553–558, 1987.
- DE LAJUDIE, P. M. et al. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (online, DOI 10.1099/ijsem.0.003426), 2019.
- DE MEYER, S. E. et al. Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high-affinity cytochrome *cbb3* oxidase genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 29, n. 8, p. 609–619, 2016.
- DE SOUZA, A. O.; DA SILVA, M. J. Estudo taxonômico do gênero *Chamaecrista* Moench. (Caesalpinioideae, Leguminosae) na Floresta Nacional de Silvânia, Goiás, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 70, n. 1, p. 73–88, 2015.
- DELAMUTA, J. R. M. et al. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3342–3351, 2013.
- DELAMUTA, J. R. M. et al. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium*

- embrapense* sp. nov nitrogen fixing symbionts of tropical forage legumes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4424–4433, 2015.
- DELAMUTA, J. R. M. et al. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3078–3087, 2016.
- DELAMUTA, J. R. M. et al. Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojajae. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 254–265, 2017.
- DIABATE, M. et al. Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African tropical rainforest and inoculation response of native species useful in reforestation. **New Phytologist**, v. 166, p. 231–239, 2005.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.
- DOS SANTOS, J. M. F. et al. Diverse genotypes of *Bradyrhizobium* nodulate herbaceous *Chamaecrista* (Moench) (Fabaceae, Caesalpinioideae) species in Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 69–79, 2017.
- DOYLE, J. J. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1289–1295, 2011.
- DURÁN, D. et al. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2072–2078, 2014.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- ERISMAN, J. W. et al. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, p. 20130116–20130116, 2013.
- FAKRUDDIN, M. et al. Identification and characterization of microorganisms: DNA-fingerprinting methods. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 397–404, 2013.
- FAQUIN, V. Exigências nutricionais e funções dos nutrientes. In: FAQUIN, V. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. v. 3p. 73–80.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a Maximum Likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, p. 368–376, 1981.
- FERGUSON, B. J. et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 61–76, 2010.

- FONSECA, B. M. et al. Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian Cerrado. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–16, 2012.
- GAUNT, M. W. et al. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2037–2048, 2001.
- GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 733–739, 2005.
- GIRAUD, E. et al. Legumes symbioses : absence of *nod* genes in photosynthetic *Bradyrhizobia*. **Science**, v. 316, n. 1 Juny, p. 1307–1312, 2007.
- GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015.
- GOPALASUBRAMANIAM, S. K. et al. Cloning and characterization of a caesalpinoid (*Chamaecrista fasciculata*) hemoglobin : The structural transition from a nonsymbiotic hemoglobin to a leghemoglobin. **Proteins**, v. 72, p. 252–260, 2008.
- GORIS, J. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81–91, 2007.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–224, 2010.
- GRAHAM, P. H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 511–517, 1964.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872–877, 2003.
- GUREVICH, A. et al. QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.
- HADRI, A. et al. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. (Eds.). **The Rhizobiaceae**. 1. ed. The Netherlands: Springer, 1998. p. 566.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HELENE, L. C. F. et al. *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1827–1834, 2017.
- HENSON, T. M.; CORY, W.; RUTTER, M. T. Extensive variation in cadmium tolerance and accumulation among populations of *Chamaecrista fasciculata*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63200, 2013.

HIRSCH, A. M. Developmental biology of legume nodulation. **New Phytologist**, v. 122, n. 40, p. 211–237, 1992.

HIRSCH, A. M., YU N., MA N., SCHWARTZ A. R., DE HOFF P.L. The *Chamaecrista fasciculata* nitrogen-fixing symbiosis. In: BOTANY AND MYCOLOGY 2009. **Electronic Abstract** ... **Abstract** 446. **Disponível em:** <http://www.2009.botanyconference.org/engine/search/index.php?func=detail&aid=446>. Acesso em 5 fev. 2019.

HOLLIS, A. B.; KLOOS, W. E.; ELKAN, G. H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. **Journal of General Microbiology**, v. 123, n. 1981, p. 215–222, 1981.

HOUCK, M. J. **Patridge pea (*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene)**. Disponível em: <[https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg\\_chfa2.pdf](https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_chfa2.pdf)>. Acesso em: 2 fev. 2019.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 825–834, 1991.

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, DF: Embrapa-CNPAF, 1984. p. 9–89. (Documento, 44).

HUNGRIA, M. et al. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1349–1361, 2001.

HUNGRIA, M. et al. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2008. (Documento, 79).

HUNGRIA, M. et al. Isolation and growth of rhizobia. In: HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (Eds.). **Working with rhizobia**. Canberra: Australian Centre for International Agriculture Research (ACIAR), 2016. p. 39–60.

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

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; DELAMUTA, J. R. M. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New Jersey: Wiley Sons Inc., 2015. v. 1p. 191–202.

IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Rhizobial Nod factors are required for cortical cell division in the nodule morphogenetic programme of the *Aeschynomeneae* legume *Arachis*. **Plant Biology**, v. 13, p. 794–800, 2011.

IBÁÑEZ, F.; WALL, L.; FABRA, A. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing

- symbioses: intercellular invasion of the roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 8, p. 1905–1918, 2017.
- IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. Notes on the generic status of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Brittonia**, v. 28, n. 1, p. 28–36, 1976.
- ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 733–740, 2009.
- JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v. 11, n. 2, p. 37–50, 1912.
- JEZOREK, H.; STILING, P.; CARPENTER, J. Ant predation on an invasive herbivore: can an extrafloral nectar-producing plant provide associational resistance to *Opuntia* individuals? **Biological Invasions**, v. 13, p. 2261–2273, 2011.
- JONES, K. M. et al. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium - Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 619–633, 2007.
- JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., a genus of slow growing root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 32, p. 378–380, 1982.
- KÄMPFER, P. Systematics of prokaryotes: The state of the art. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 1, p. 3–11, 2012.
- KÄMPFER, P. Continuing importance of the “phenotype” in the genomic era. **Methods in Microbiology**, v. 41, p. 307–320, 2014.
- KÄMPFER, P.; GLAESER, S. P. Under the microscope: prokaryotic taxonomy in the sequencing era and the role of MLSA in classification. **Microbiology Australia**, v. 32, n. 2008, p. 66–70, 2011.
- KÄMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era - the polyphasic approach revisited. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 291–317, 2012.
- KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389–397, 1994.
- KIM, M. et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 346–351, 2014.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, n. 4, p. 408–18, 1995.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2567–2572, 2005.

- KUYKENDALL, L. D. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 501–505, 1992.
- LAGUERRE, G. et al. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2029–2036, 1996.
- LAGUERRE, G. et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, n. 2001, p. 981–993, 2001.
- LO, S. et al. Isolation of novel *Afipia septicemium* and identification of previously unknown bacteria *Bradyrhizobium* sp. OHSU\_III from blood of patients with poorly defined illnesses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76142, 2013.
- LPWG. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress , prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. April, p. 217–248, 2013.
- LPWG. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. February, p. 44–77, 2017.
- LPSN. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/bradyrhizobium.html>>. Acesso em: 17 jun. 2019.
- LUDWIG, W. et al. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. **Plant and Soil**, v. 204, p. 1–19, 1998.
- LUDWIG, W.; KLENK, H.-P. A Phylogenetic backbone and taxonomic framework for Prokaryotic systematics. In: R.BOONE, D.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. (Eds.). . **Bergey’s manual of systematics of Archaea and Bacteria**. New York: Springer, 2001. p. 49–65.
- MAHATO, N. K. et al. Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 10, p. 1357–1371, 2017.
- MADSEN, L. H. et al. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. **Nature communications**, v. 1, n. 10, p. 1–12, 2010.
- MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387–402, 2008.
- MARTENS, M. et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 200–214, 2008.
- MARTIN, B. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 13, p. 3479–3483, 1992.

- MEIER-KOLTHOFF, J. P. et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 60, p. 1–14, 2013.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KLENK, H. P.; GÖKER, M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 352–356, 2014.
- MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315–332, 2006.
- MENNA, P. et al. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1–3, p. 120–130, 2009.
- MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 2934–2950, 2009.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 3052–3067, 2011.
- MICHÉ, L. et al. Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2152–2164, 2010.
- MOORE, E. R. B. et al. Microbial systematics and taxonomy: Relevance for a microbial commons. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 430–438, 2010.
- MORRIS, J. B. Showy partridge pea [*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene] with potential for cultivation as a multi-functional species in the United States. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7, p. 1577–1581, 2012.
- MOULIN, L.; MUNIUE, A.; DREYFUS, B. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948–950, 2001.
- MOUSAVI, S. A. et al. 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.
- MUS, F. et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698–3710, 2016.
- NAISBITT, T.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I. The evolutionary significance of the legume genus *Chamaecrista*, as determined by nodule structure. **New Phytologist**, v. 122, p. 487–492, 1992.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O. et al. (Eds.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 3–8.

OKAZAKI, S. et al. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 110, p. 17131–17136, 2013.

OKAZAKI, S. et al. *Rhizobium* – legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. **The ISME Journal**, p. 1–11, 2015.

OLDROYD, G. E. D. et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 119–144, 2011.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2013.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. A. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 7, p. 566–576, 2004.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing Prokaryotes. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes: Prokaryotic physiology and biochemistry**. 4. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 427–451.

OVERBEEK, R. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 206–214, 2014.

PARKER, M. A. The spread of *Bradyrhizobium* lineages across host legume clades: from *Abarema* to *Zygia*. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 3, p. 630–640, 2015.

PARKER, M. A.; KENNEDY, D. A. Diversity and relationships of bradyrhizobia from legumes native to eastern North America. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1148–1157, 2006.

PEI, A. Y. et al. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3886–3897, 2010.

PEIX, A. et al. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. October 2014, p. 17–42, 2015.

POSTGATE, J. R. Biology nitrogen fixation: Fundamentals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 296, p. 375–385, 1982.

QUAIL, M. A. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, PacificBiosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2012.

RAMASAMY, D. et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 384–391, 2014.

RAMÍREZ-BABENA, M. H. et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 2484–2490, 2008.

RANDO, J. G. et al. Phylogeny of *Chamaecrista* ser. *Coriaceae* (Leguminosae) unveils a lineage recently diversified in brazilian campo rupestre vegetation. **International Journal of Plant Sciences**, v. 177, n. 1, p. 3–17, 2016.

RATHI, S. et al. Selection of *Bradyrhizobium* or *Ensifer* symbionts by the native Indian caesalpinoid legume *Chamaecrista pumila* depends on soil pH and other edaphic and climatic factors. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, p. 1–17, 2018.

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.

RIVAS, R. et al. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1271–1275, 2004.

RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. The enveomics collection : a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. **Peer J Preprints**, v. 4, p. e1900v1, 2016.

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

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

ROSSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 209–216, 2015.

SADOWSKY, M. J.; GRAHAM, P. H.; SUGAWARA, M. Root and stem nodule bacteria of legumes. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes: Prokaryotic biology and symbiotic associations**. Berlin, Heidelberg: Springer, , 2013. p. 401–425.

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

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

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

- SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 533–542, 2009.
- SCHOULS, L. M.; SCHOT, C. S.; JACOBS, J. A. Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7241–7246, 2003.
- SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v. 32, n. 1, p. 33–57, 1998.
- SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, v. 71, n. 2, p. 91–109, 2017.
- SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 269–274, 2010.
- SINGER, S. R. et al. Venturing beyond beans and peas: what can we learn from *Chamaecrista*? **Plant Physiology**, v. 151, p. 1041–1047, 2009.
- SIQUEIRA, J. O. et al. **Microrganismos e processos biológicos do solo**: perspectiva ambiental. Brasília, DF: Embrapa-CNPAP, 1994. (Documento, 45)
- SLATKO, E. B.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of next generation sequencing technologies. **Current protocols in molecular biology**, v. 122, n. 1, p. 1–15, 2018.
- SNEATH, P.; SOKAL, R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman & Co, 1973. 573p.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia**: Methods in legume-*Rhizobium* technology. New York: Springer Verlag, 1994.
- SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. *Chamaecrista*. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22876>>. Acesso em: 30 jan. 2019.
- SPRENT, J.; FARIA, S. M. DE. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. In: SKINNER, F. A.; BODDEY, R. M.; FENDRIK, I. (Eds.). **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Springer, 1989. p. 3–11.
- SPRENT, J. I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New Phytologist**, v. 174, p. 11–25, 2007.
- SPRENT, J. I.; ARDLEY, J.; JAMES, E. K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40–56, 2017.
- SPRENT, J. I.; ARDLEY, J. K.; JAMES, E. K. South African Journal of Botany From North to South : A latitudinal look at legume nodulation processes. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 31–41, 2013.

- STACKEBRANDT, E. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043–1047, 2002.
- STACKEBRANDT, E. Defining Taxonomic Ranks. In: STACKEBRANDT et al. (Eds.). **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer, 2006. p. 29–57.
- STALEY, J. T. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1475, p. 1899–1909, 2006.
- STEPKOWSKI, T. et al. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting *Lupinus* and *Serradella* in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7041–7052, 2005.
- STERN, M. J. et al. Repetitive extrapalindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, n. July, p. 1015–1026, 1984.
- SUBBA-RAO, A. N. S. et al. The unique root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and the aquatic legume, *Neptunia nutans* (L. f.) Druce. **Planta**, v. 196, n. 2, p. 311–320, 1995.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2017.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- THOMPSON, F. L. et al. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5107–5115, 2005.
- TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249–266, 2010.
- TLUSTY, B.; GROSSMAN, J. M.; GRAHAM, P. H. Selection of rhizobia for prairie legumes used in restoration and reconstruction programs in Minnesota. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 977–983, 2004.
- TOZZI, A. M. G. DE A. Subfamília Caesalpinioideae. In: WANDERLEY, M. G. L. ET AL. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2016. p. 22–83.
- TRINICK, M. J. Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 565–578, 1979.
- TRINICK, M. J.; GALBRAITH, J. The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relationship to the cross-inoculation group concept of legumes. **The New Phytologist**, v. 86, p. 17–26, 1980.

TRUJILLO, M. E. **About International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Disponível em: <<https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/about>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

USDA. ‘Comanche’ Partridge Pea (*Chamaecrista fasciculata*). Disponível em: <[https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_PLANTMATERIALS/publications/txpmscrb10781.pdf](https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_PLANTMATERIALS/publications/txpmscrb10781.pdf)>. Acesso em: 3 fev. 2019a.

USDA. “Riley” Showy Partridge Pea (*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene). Disponível em: <[https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_PLANTMATERIALS/publications/kspmcrb10760.pdf](https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_PLANTMATERIALS/publications/kspmcrb10760.pdf)>. Acesso em: 3 fev. 2019b.

VANBERKUM, P.; FUHRMANN, J. J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 2165–2172, 2000.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285–2289, 2004.

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

VELÁZQUEZ, E. et al. Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: ZAIDI, A.; KHAN, M. S.; MUSARRAT, J. (Eds.). **Microbes for legume improvement**. Second ed. [s.l.] Springer, Cham, 2017. p. 1–43.

VELÁZQUEZ, E.; SILVA, L.; PEIX, A. Legumes: A healthy and ecological source of flavonoids. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 2, p. 109–144, 2010.

VERSALOVIC, J. et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

VINCENT, J. **Manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. (International Biological Programme Handbook, 15).

WEISBURG, W. G. et al. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WILLEMS, A. et al. Comparison of sequence analysis of 16S – 23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA – DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 623–632, 2001.

WILLEMS, A. et al. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 203–210, 2003.

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

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.

YAO, Y. et al. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 1831–1837, 2015.

ZAKHIA, F.; DE LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v. 21, p. 569–576, 2001.

ZHI, X. Y. et al. Prokaryotic systematics in the genomics era. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 1, p. 21–34, 2012.

## 6. Resultados e Discussão

### ARTIGO

***Bradyrhizobium niftali* sp. nov., an effective nitrogen-fixing symbiont of partridge pea [*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene], a native caesalpinoid legume broadly distributed in USA**

Milena Serenato Klepa,<sup>1,2,3,#</sup> Maria Clara de Oliveira Urquiaga,<sup>1,2,4,#</sup> Padma Somasegaran,<sup>5</sup>  
Jakeline Renata Marçon Delamuta,<sup>1,3</sup> Renan Augusto Ribeiro,<sup>3</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>*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, SBN, Quadra 2, Bloco L, Lote 06, Edifício Capes, 70.040-020 Brasília, Distrito Federal, Brazil;*

<sup>5</sup>*Formerly with BYOZIME Inc., Saint Joseph, Missouri, USA*

# Both authors contributed equally to this study

\* Corresponding author

# *Bradyrhizobium niftali* sp. nov., an effective nitrogen-fixing symbiont of partridge pea [*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene], a native caesalpinoid legume broadly distributed in the USA

Milena Serenato Klepa,<sup>1,2,3†</sup> Maria Clara de Oliveira Urquiaga,<sup>1,2,4†</sup> Padma Somasegaran,<sup>5</sup>  
Jakeline Renata Marçon Delamuta,<sup>1,3</sup> Renan Augusto Ribeiro<sup>3</sup> and Mariangela Hungria<sup>1,2,3,\*</sup>

## Abstract

Information about the symbionts of legumes of the Caesalpinioideae subfamily is still limited, and we performed a polyphasic approach with three *Bradyrhizobium* strains—CNPSo 3448<sup>T</sup>, CNPSo 3394 and CNPSo 3442—isolated from *Chamaecrista fasciculata*, a native legume broadly distributed in the USA. In the phylogenetic analysis of both the 16S rRNA gene and the intergenic transcribed spacer, the CNPSo strains were clustered within the *Bradyrhizobium japonicum* superclade. Multilocus sequence analysis with six housekeeping genes—*glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *atpD* and *dnaK*—indicated that *Bradyrhizobium diazoefficiens* is the closest species, with 83% of nucleotide identity. In the genome analyses of CNPSo 3448<sup>T</sup>, average nucleotide identity and digital DNA–DNA hybridization results confirmed higher similarity with *B. diazoefficiens*, with values estimated of 93.35 and 51.50%, respectively, both below the threshold of the same species, confirming that the CNPSo strains represent a new lineage. BOX-PCR profiles indicated high intraspecific genetic diversity between the CNPSo strains. In the analyses of the symbiotic genes *nodC* and *nifH* the CNPSo strains were clustered with *Bradyrhizobium arachidis*, *Bradyrhizobium forestalis*, *Bradyrhizobium cajani*, *Bradyrhizobium kavangense* and *Bradyrhizobium vignae*, indicating a different phylogenetic history compared to the conserved core genes. Other physiological (C utilization, tolerance to antibiotics and abiotic stresses), chemical (fatty acid profile) and symbiotic (nodulation host range) properties were evaluated and are described. The data from our study support the description of the CNPSo strains as the novel species *Bradyrhizobium niftali* sp. nov., with CNPSo 3448<sup>T</sup> (=USDA 10051<sup>T</sup>=U687<sup>T</sup>=CL 40<sup>T</sup>) designated as the type strain.

Among the ecological roles of various micro-organisms, biological nitrogen fixation is one of the most relevant processes for life on Earth [1]. The greatest contribution of biological nitrogen fixation occurs with the establishment of a symbiotic partnership between a group of soil bacteria collectively known as ‘rhizobia’, and a broad range of species of the family *Fabaceae* (=Leguminosae) [2], with the typical development of specialized structures on roots and occasionally on stems, called nodules [3]. The rhizobia provide

assimilative forms of nitrogen to the host legume, and receive from the plant photosynthesis products [4].

The family *Fabaceae* was traditionally divided into three subfamilies, the *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* and *Papilionoideae* (=Faboideae) [5]. However, a recent phylogenetic study suggested the re-circumscription of this family into the subfamilies *Caesalpinioideae*, *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Duparquetioideae* and *Papilionoideae* [5]. The nodulation ability is generally considered rare in the

**Author affiliations:** <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, Brazil; <sup>4</sup>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, SBN, Quadra 2, Bloco L, Lote 06, Edifício Capes, 70.040-020, Brasília, Brazil; <sup>5</sup>Formerly with BYOZIME Inc., Saint Joseph, Missouri, USA.

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

**Keywords:** *Bradyrhizobium*; Caesalpinioideae; *Chamaecrista*; nodulation; MLSA; ANI; dDDH.

**Abbreviations:** ANI, average nucleotide identity; dDDH, digital DNA–DNA hybridization; DDH, DNA–DNA hybridization; LB, Luria–Bertani; MLSA, multilocus sequence analysis; NI, nucleotide identity; OGRl, overall genome related index.

†These authors contributed equally to this work.

The following new sequences have been deposited in GenBank/EMBL/DBJ: 16S rRNA gene of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK673807), CNPSo 3442 (MK673806), CNPSo 3394 (MK673805); ITS of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK674784), CNPSo 3442 (MK674783), CNPSo 3394 (MK674782); *glnII* of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675791), CNPSo 3442 (MK675790), CNPSo 3394 (MK675789); *recA* of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675797), CNPSo 3442 (MK675796), CNPSo 3394 (MK675795); *rpoB* of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675800), CNPSo 3442 (MK675799), CNPSo 3394 (MK675798); *gyrB* of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675794), CNPSo 3442 (MK675793), CNPSo 3394 (MK675792); *nodC* of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675806), CNPSo 3442 (MK675805), CNPSo 3394 (MK675804); *nifH* of CNPSo 3448<sup>T</sup> (MK675803), CNPSo 3442 (MK675802), CNPSo 3394 (MK675801). Genome sequences of *Bradyrhizobium niftali* CNPSo 3448<sup>T</sup> (SPQT00000000).

**Table 1.** Strains used in this study

Species/strain name	Other strain names	Original host species	Geographical origin	Reference
<i>Bradyrhizobium niftali</i> CNPSo 3448 <sup>T</sup>	USDA 10051 <sup>T</sup> , U687 <sup>T</sup> , CL 40 <sup>T</sup>	<i>Chamaecrista fasciculata</i>	Savannah - MO (USA), 106 km from Kansas City, 39.94668° N, -94.83081° E	This study
<i>Bradyrhizobium niftali</i> CNPSo 3394	CL 01	<i>Chamaecrista fasciculata</i>	Saint Joseph - MO (USA), 89 km from Kansas City, 39.7666° N, -94.85607° E	This study
<i>Bradyrhizobium niftali</i> CNPSo 3442	CL 22	<i>Chamaecrista fasciculata</i>	Camden Point - MO (USA), 54 km from Kansas City, 39.4535° N, -94.74256° E	This study
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 <sup>T</sup>	TAL 102 <sup>T</sup> , TISTR 339 <sup>T</sup> , SEMIA 5032 <sup>T</sup> , CNPSo 56 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	USA	Delamuta et al. [31]
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 <sup>T</sup>	ATCC 10324 <sup>T</sup> , CCUG 27876 <sup>T</sup> , CIP 106093 <sup>T</sup> , DSM 30131 <sup>T</sup> , HAMBI 2314 <sup>T</sup> , NBRC 14783 <sup>T</sup> , JCM 20679 <sup>T</sup> , LMG 6138 <sup>T</sup> , NRRL B-4507 <sup>T</sup> , NRRL L-241 <sup>T</sup> , VKM B-1967 <sup>T</sup> , CNPSo 158 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	USA	Jordan [66]
<i>Bradyrhizobium betae</i> LMG 21987 <sup>T</sup>	PL7HG1 <sup>T</sup> , CECT 5829 <sup>T</sup> , CNPSo 2079 <sup>T</sup>	<i>Beta vulgaris</i>	Spain	Rivas et al. [57]
<i>Bradyrhizobium shewense</i> ERR11 <sup>T</sup>	HAMBI 3532 <sup>T</sup> , LMG 30162 <sup>T</sup>	<i>Erythrina brucei</i>	Ethiopia	Aserse et al. [67]
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99 <sup>T</sup>	5LMG 26739 <sup>T</sup> , 5HAMBI 3284 <sup>T</sup>	<i>Glycine max</i>	Ottawa	Yu et al. [68]

*Caesalpinioideae*, with only eight reported nodulation genera [6–8], and among them, the pantropical genus *Chamaecrista*, which comprises 330 species [9], many endemic in Brazil [10]. The genus *Chamaecrista* is the most successful nodulation genus within the *Caesalpinioideae*, where all species tested to date were able to nodulate. Moreover, it is one of the few nodulation *Caesalpinioideae* genera that extended to temperate regions [8, 11].

The genus *Chamaecrista* varies in habit from herbaceous, shrubby to arboreal species, each one showing different nodule structures. In general, the arboreal *Chamaecrista* species retain their N<sub>2</sub>-fixing bacteroids within modified infection threads, known as fixation threads, whereas in shrubby species, the microsymbionts are bounded with thinner wall threads, and in herbaceous species, the rhizobia are released into the symbiosomes [12]. Therefore, the genus *Chamaecrista* is located in an intermediate position between legumes with basal and advanced nodule structure, suggesting an independent event of nodulation origin [11, 13].

Although the diversity of rhizobia-nodulating *Chamaecrista* is still poorly known, the genus *Bradyrhizobium* has been considered as the main microsymbiont, as shown in reports from Senegal [14], USA [15], Australia [16], Brazil [17] and India [18]. However, to date, only *Bradyrhizobium ripae* has been formally described as a rhizobial species from *Chamaecrista*, in a study including one strain isolated from the nodules of *Chamaecrista biensis* in Namibia [19]. Therefore, studies focusing at microsymbionts of this key *Caesalpinioideae* genus may increase our knowledge about the rhizobial diversity and may also contribute with issues about the evolutionary history of symbiotic relationships.

The present study used a polyphasic approach to characterize three strains (CNPSo 3448<sup>T</sup>, CNPSo 3394 and CNPSo 3442) isolated from root nodules of *Chamaecrista fasciculata*.

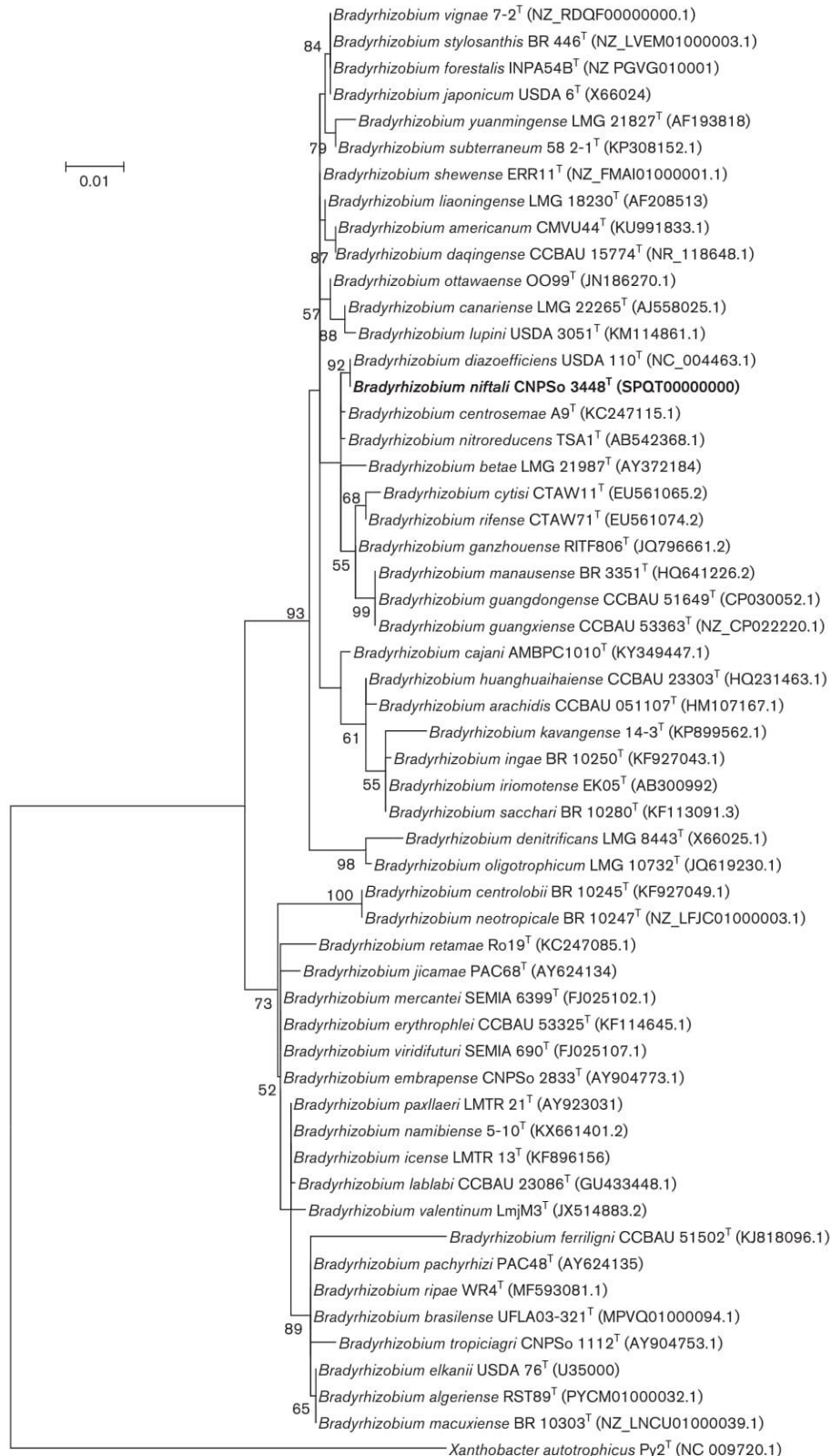
## ISOLATION AND ECOLOGY

Three bradyrhizobial strains used in this study were isolated from root nodules of partridge pea (*C. fasciculata*), a native legume broadly distributed in the USA [20]. Root nodules were collected from plants growing at different sites along the Interstate Highway 29, which connects the states of Missouri (MO) and Nebraska (NE), USA. The sampling points are indicated in Table 1. Nodule surface sterilization and rhizobia isolation and growth in modified-YMA medium were performed as described before [21, 22].

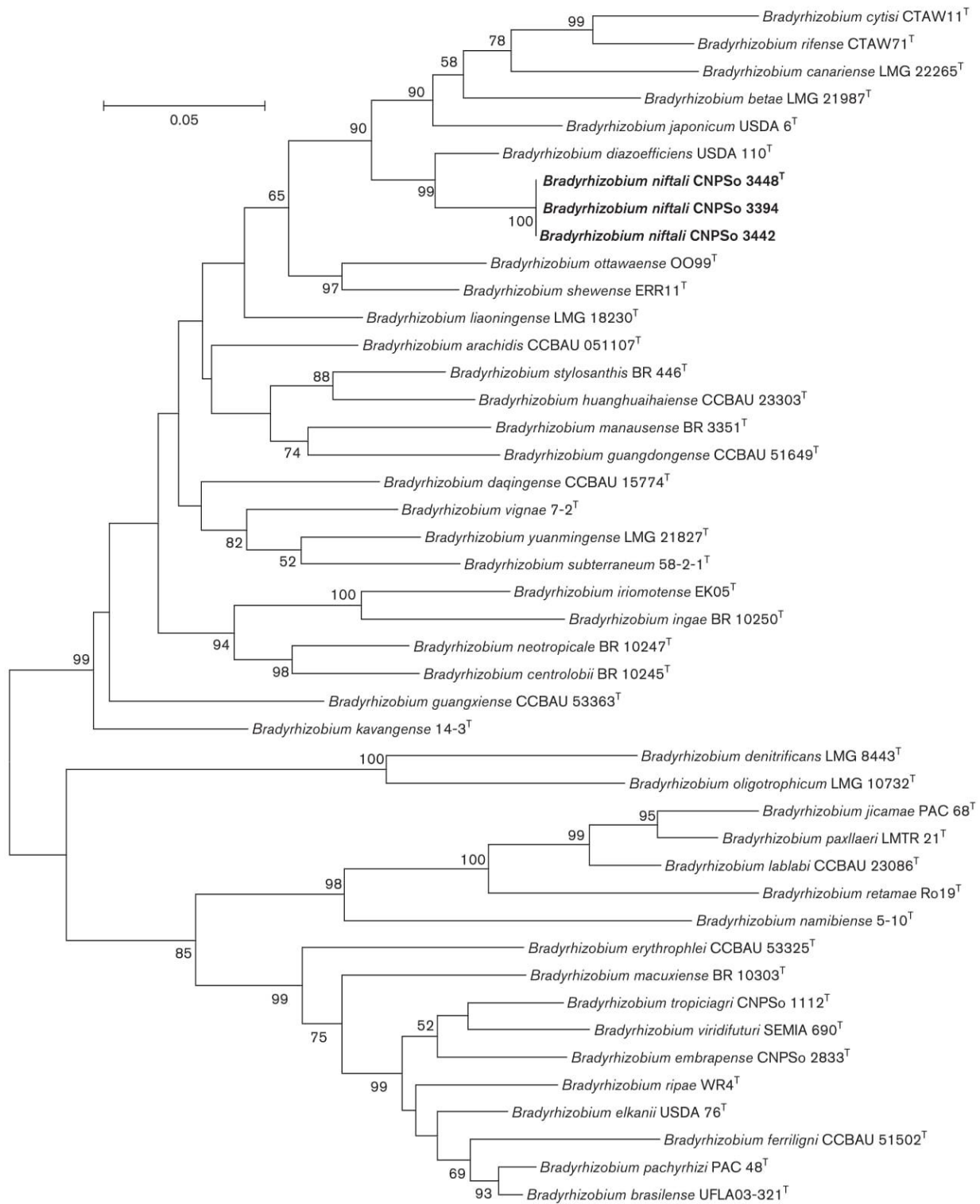
The strains are deposited at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja (WFCC Collection No. 1213, WDCM Collection No. 1054), in Londrina, State of Paraná, Brazil, and also in other culture collections of USA (United States Department of Agriculture, USDA collection) and Uruguay (Insitituto Nacional de Investigación Agropecuária, U Collection), both associated with the World Federation Culture Collection (WFCC). The cultures are long-term stored by cryopreservation in modified-YM with 30% glycerol (v/v) at -80 °C and -150 °C and by lyophilization, as described previously [23].

## PHYLOGENY

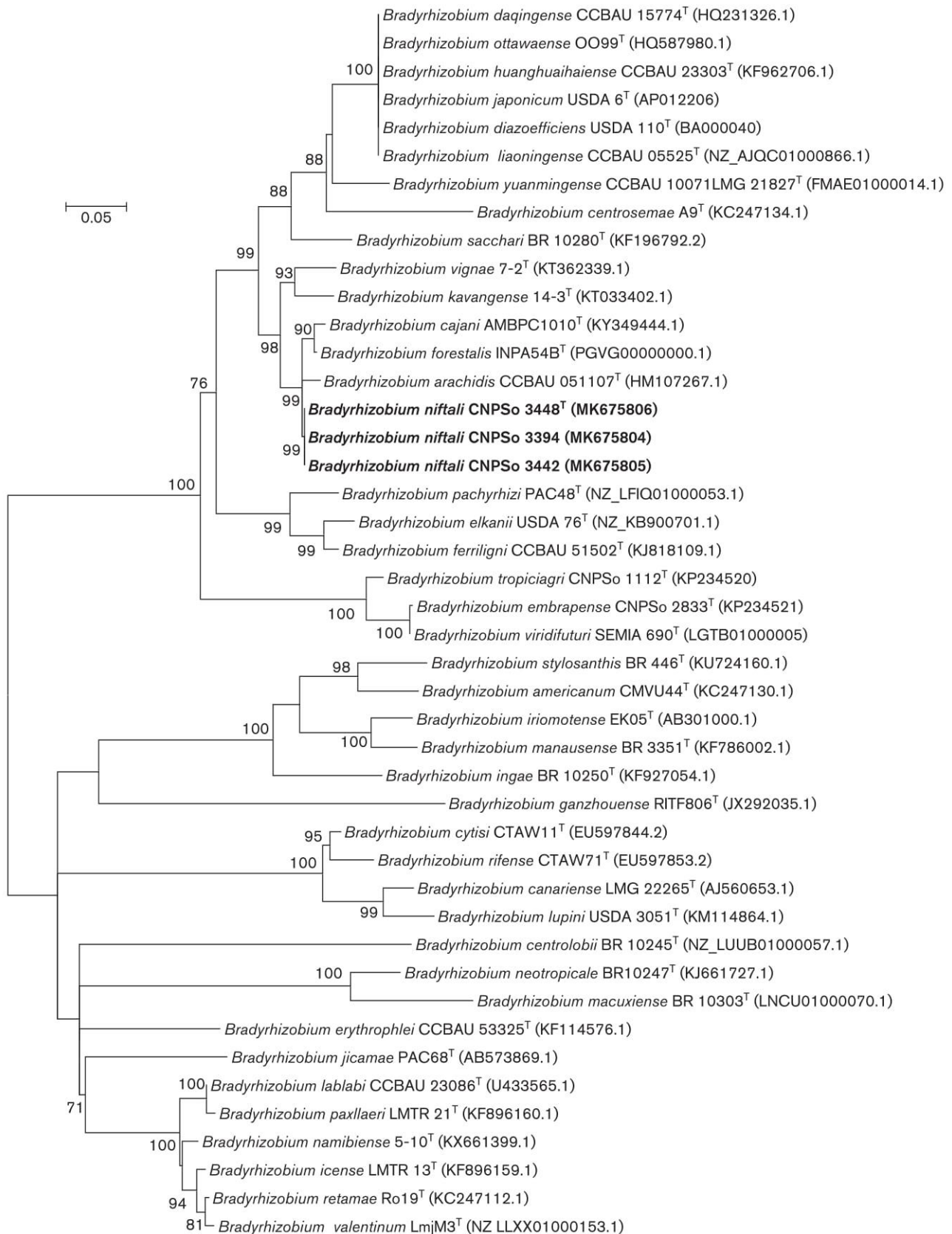
Total DNA was extracted by the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Primers and amplification conditions used for the 16S rRNA



**Fig. 1.** Maximum-likelihood (ML) phylogeny based on the 16S rRNA genes (947 bp) of *Bradyrhizobium niftali* strains (in bold) and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in parentheses. The ML tree was obtained using the T92 Tamura three-parameter model +G model by using MEGA version 6. Bootstrap values >70% are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as an outgroup. Bar, one substitution per 100 nucleotide positions.



**Fig. 2.** Maximum-likelihood (ML) phylogeny based on the concatenated *glnII+gyrB+recA+rpoB* genes (1 786 bp) of *Bradyrhizobium niftali* strains (in bold) and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in Table S2. The ML tree was obtained using the GTR+G+I model by MEGA version 6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar, five substitutions per 100 nucleotide positions.



**Fig. 3.** Maximum-likelihood (ML) phylogeny based on the *nodC* genes (426 bp) of *Bradyrhizobium niftali* strains (in bold) and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in parentheses. The ML tree was obtained using the T92 Tamura three-

parameter model +G+I model by using MEGA version 6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar, five substitutions per 100 nucleotide positions.

gene, 16S–23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS), housekeeping genes (*glnII*, *recA*, *gyrB* and *rpoB*), *nifH* and *nodC* genes are specified in Table S1 (available in the online version of this article). The PCR products were purified using the PureLink kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Sequencing analysis was performed on an ABI 3500XL, as described before [24]. For the *atpD* and *dnaK* genes, sequences were retrieved from the genomes of type species and from the genome of strain CNPSo 3448<sup>T</sup>. The accession numbers of the sequences obtained in this study, as well as those retrieved from the GenBank database, are shown in Table S2. Multiple sequence alignments were obtained with MUSCLE [25]. For the multilocus sequence analysis (MLSA), the sequences of housekeeping genes were concatenated with SeaView version 4.7 [26]. The best evolutionary distance model was defined with the lowest Bayesian information criterion scores for maximum-likelihood reconstructions on the MEGA software version 6 [27]. The evolutionary models varied according to the different alignments and are inferred in the figures. The statistical support bootstrap was evaluated using 1000 pseudoreplicates [28]. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as outgroup for the 16S rRNA phylogeny. For the ITS analysis, the phylogram was reconstructed based on the neighbour-joining model, as previously described [23]. Nucleotide identities (NIs) were calculated with BioEdit version 7.0.4.1 [29] for single and concatenated genes.

It has been broadly reported that in the 16S rRNA gene phylogeny the *Bradyrhizobium* species are grouped in two well-supported superclades, of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* [30, 31]. Considering the aligned partial sequences of the 16S rRNA gene, the three CNPSo strains were also clustered within the *B. japonicum* superclade; more specifically, the three CNPSo strains were clustered with the type strains of *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium shewense*, *Bradyrhizobium betae* and *Bradyrhizobium ottawaense* (Fig. S1), showing 100 % similarity to each other, as well as with these four closest type strains (Table S3). The 16S rRNA phylogeny was also built considering the complete aligned sequences retrieved from the genomes of the type species and of strain CNPSo 3448<sup>T</sup>, and confirmed the clustering within the *B. japonicum*

superclade, showing 100 % similarity to *B. diazoefficiens* (Fig. 1; Table S3). However, the results emphasize the high conservation of the 16S rRNA in *Bradyrhizobium*, not allowing species delineation [23, 30–34].

In order to increase the knowledge about the ribosomal region, many taxonomists have analysed a more variable region, the ITS between the 16S and the 23S rRNA genes [23, 30, 31]. In the ITS phylogram, the three CNPSo strains formed a well-supported clade (Fig. S2), with *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> as the closest type strain, showing 95 % of NI, and less than 92.8 % with the other species (Table S3); these values are below the threshold of 95.5 % of similarity indicated by Willems et al. [35] to differentiate *Bradyrhizobium* species. One explanation for *B. diazoefficiens* not being the closest type strain in the ITS phylogeny relies on a 37 bp insert found in the sequence of this species (data not shown). Interestingly, differences in the evolution patterns of the ribosomal region have also been reported in other studies with *Bradyrhizobium* [23, 36–40].

The analysis of housekeeping genes, with an emphasis on the MLSA with the concatenated sequences has been used to improve phylogenetic information [41]. Although conserved, housekeeping genes have a faster rate of evolution than ribosomal genes, providing a better resolution at the species level [42, 43]; consequently, it has been suggested that a novel species should be identified primary based on the MLSA phylogeny. The MLSA has also been successfully applied in studies with the genus *Bradyrhizobium* [30–32]. In this study, the MLSA phylogeny with four concatenated genes (*glnII*, *gyrB*, *recA* and *rpoB*) grouped the three CNPSo strains in a distinct group with 100 % bootstrap support, and confirmed *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> as the nearest species (Fig. 2). The NI of the concatenated genes between the three CNPSo strains was of 100 %, and with the other close members of the genus *Bradyrhizobium* the NI ranged from 92.7 % to 97.3 % (Table S3). This evolutionary pattern to the three CNPSo strains was confirmed in the analyses of each single housekeeping gene, *glnII* (Fig. S3), *gyrB* (Fig. S4), *recA* (Fig. S5) and *rpoB* (Fig. S6) and the NI values for each gene are shown in Table S3. In order to improve the resolution power of new taxa status of the CNPSo group, the sequences of *atpD* and *dnaK* were retrieved from the

**Table 2.** ANI and dDDH values between *Bradyrhizobium niftali* CNPSo 3448<sup>T</sup> and closely related *Bradyrhizobium* species

Strain used as reference	ANI (%)	dDDH (%)
	CNPSo 3448 <sup>T</sup>	CNPSo 3448 <sup>T</sup>
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 <sup>T</sup>	93.35	51.50
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 <sup>T</sup>	88.95	37.40
<i>Bradyrhizobium shewense</i> ERR11 <sup>T</sup>	88.15	36.40
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> OO99 <sup>T</sup>	88.32	35.80

**Table 3.** Distinctive morpho-physiological features of *B. niftali* CNPSo 3448<sup>T</sup> and closely related strains

Strains: 1, CNPSo 3448<sup>T</sup>; 2, *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup>; 3, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6<sup>T</sup>; 4, *Bradyrhizobium betae* LMG 21987<sup>T</sup>. +, Growth; w, weakly positive; –, no growth.

Characteristics	1	2*	3*	4*
Carbon source utilization:				
Glycerol	+	w	w	w
D-Arabinose	+	+	w	+
L-Arabinose	+	w	+	+
D-Ribose	w	+	+	+
L-Xylose	+	+	w	+
D-Adonitol	w	–	–	–
Methyl βD-Xylopyranoside	w	w	w	–
D-Glucose	+	w	w	w
D-Fructose	+	w	w	w
D-Mannose	+	w	w	w
L-Sorbose	w	–	–	–
L-Rhamnose	+	w	w	w
Dulcitol	+	–	–	–
D-Mannitol	w	w	w	–
D-Sorbitol	w	w	w	–
N-Acetylglucosamine	+	–	–	–
Arbutin	w	–	–	–
Maltose	w	–	–	–
Sucrose	+	–	–	–
Trehalose	w	–	–	–
Inulin	w	–	–	–
Melezitose	w	–	–	–
Raffinose	w	–	–	–
Glycogen	+	–	–	+
Xylitol	w	–	–	–
Gentiobiose	w	–	–	–
Turanose	w	–	–	–
D-Arabitol	w	w	w	–
L-Arabitol	w	–	–	–
Potassium gluconate	+	–	–	–
Potassium 2-ketogluconate	+	–	–	+
Potassium 5-ketogluconate	+	–	–	–
Enzymatic activity:				
Urease	+	+	+	–
Tolerance to antibiotics (μg/disc):				
Ampicillin (10)	–	–	+	–
Erythromycin (15)	–	–	+	+
Neomycin (30)	–	–	–	w
Penicillin G (10 U)	+	+	+	w
Tetracycline (30)	–	–	–	+
Cefuroxime (30)	–	–	–	+

\*Data obtained in the same laboratory and the same conditions by Delamuta et al. [31].

genomes of CNPSo 3448<sup>T</sup> and of the closest type strains. In the phylogram of six genes—*atpD*+*dnaK*+*glnII*+*gyrB*+*recA*+*rpoB*—the same evolutionary pattern was found, and the CNPSo 3448<sup>T</sup> strain remained in a single and consistent

position, with *B. diazoefficiens* as the closely related species, with 100 % bootstrap support (Fig. S7). Considering the six housekeeping genes, the CNPSo 3448<sup>T</sup> and *B. diazoefficiens* shared 83 % similarity, decreasing to NI values with the



**Fig. 4.** (a) *Chamaecrista fasciculata*, the original host plant, inoculated with strain CNPSo 3448<sup>T</sup>; (b) *C. fasciculata* root with indeterminate nodules formed by CNPSo 3448<sup>T</sup>; (c) effective and indeterminate nodules with internal pink colour formed by CNPSo 3448<sup>T</sup> on *C. fasciculata*; (d) siratro (*Macrottilium atropurpureum*), a promiscuous Papilionoid legume broadly used in nodulation ability tests; (e) siratro root with determinate nodules formed by CNPSo 3448<sup>T</sup> strain; (f) A effective and determinate nodules with internal pink colour formed by CNPSo 3448<sup>T</sup> strain on siratro. Plants grown under axenic conditions at the greenhouse.

other species lower than 81.2% (Table S3). Recently, the threshold of 97% similarity of five housekeeping genes sequences was proposed in *Bradyrhizobium* species delineation [44]; therefore, these results confirm that the strains in our study belong to a new rhizobial species.

Symbiotic genes are considered accessory, therefore, are not included in the main core of genes used for the definition of the taxonomic position of bacteria. However, some genes related to the biological nitrogen fixation process can add valuable information about the symbiosis, such as host-specificity, biogeography and symbiovars [24, 31, 32, 45, 46]. We analysed the *nodC* and *nifH* phylogenies, involved in the nodulation and nitrogen-fixation abilities, respectively. In the *nodC* phylogenetic tree, the three CNPSo strains were clustered with *Bradyrhizobium arachidis* CCBAUT 051107<sup>T</sup>, isolated from nodules of *Arachis*

*hypogaea* grown in China, with *Bradyrhizobium cajani* AMBPC 1010<sup>T</sup> isolated from *Cajanus cajan* nodules in the Dominican Republic and with *Bradyrhizobium forestalis* INPA 54B<sup>T</sup> isolated from mimosoid nodules in the Amazon region (Fig. 3). The *nifH* phylogeny also clustered the three CNPSo strains in a group related to *B. forestalis* INPA 54B<sup>T</sup> and *B. arachidis* CCBAUT 051107<sup>T</sup>. In addition, *nifH* showed relatedness with *Bradyrhizobium vignae* 7-2<sup>T</sup> and *Bradyrhizobium kavangense* 14-3<sup>T</sup>, both isolated from *Vigna unguiculata* on subsistence farms in Namibia (Fig. S8). Moreover, in a recent study with isolates from *Chamaecrista pumila* in India, the *nifH* phylogeny also grouped some of these Indian rhizobia with *B. arachidis* [18]. Therefore, the comparison of ribosomal and housekeeping genes with the symbiotic genes of the three CNPSo strains suggests different evolutionary histories.

## GENOME FEATURES

Total DNA of strain CNPSo 3448<sup>T</sup> was used to prepare the sequence library with the Nextera XT kit according to the manufacturer's protocol. The library was sequenced with the MiSeq platform (Illumina) at Embrapa Soja. The reads were assembled with the A5-MiSeq pipeline (*de novo*) version 20140604, and the draft genome was deposited at the NCBI (accession number SPQT00000000; biosample SAMN11254745). The final genome assembly resulted in 144 contigs, with N50 of 217 177 bp and 104-fold coverage. The genome size of strain CNPSo 3448<sup>T</sup> was estimated at 9 787 683 bp with QUAST version 2.0 [47], using default parameters. The genome also annotated with RAST version 2.0 [48] and 9348 coding DNA sequences (CDSs) were identified, with 68 % of them classified in known subsystems. Nodulation genes are apparently in a symbiotic island and organized as in *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> and other bradyrhizobia, as *nodDABCSUIJ* and also containing *nolO* and *nodZ*, but we found only one copy of the regulatory *nodD*.

As an alternative to DNA–DNA hybridization (DDH), overall genome related index (OGRI) parameters have been increasingly used to evaluate taxonomic position, and several software tools are available to compare genomes *in silico* [41, 49]. Two OGRIs were used to compare the genomes of CNPSo 3448<sup>T</sup> and of the closest species *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> (NC\_004463.1) and *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (NC\_017249.1). *B. shewense* ERR11<sup>T</sup> (NZ\_FMAI01000001.1) and *B. ottawaense* OO99<sup>T</sup> (NZ\_CP029425.1) were also included since they shared 100 % similarity on the phylogeny of partial 16S rRNA sequences including the three CNPSo strains. Average nucleotide identity (ANI) is successfully recognized for taxonomic purposes, and cut-off values of 95–96 % of ANI have been accepted as equivalent to 70 % of DDH [50–52]. The ANI was calculated using the ANI calculator [53] and the values between CNPSo 3448<sup>T</sup> and *B. diazoefficiens*, *B. japonicum*, *B. shewense* and *B. ottawaense* were estimated at 93.35, 88.95, 88.13 and 88.32 %, respectively (Table 2). Therefore, the results confirm that the three CNPSo strains belong to a new species, with the type strain sharing less than 95–96 % ANI with all described *Bradyrhizobium* species.

The other OGRI method employed was the digital DDH (dDDH), with 70 % similarity as the threshold for species boundaries [54]. The analysis was performed with the Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) version 2.1. [54], using Formula 2 (identities/HSP length), as recommended. The highest dDDH values were found between CNPSo 3448<sup>T</sup> and *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> and *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, of 51.50 and 37.40 %, respectively (Table 2), in agreement with ANI analysis and below the threshold of the same species.

The genome G+C content of CNPSo 3448<sup>T</sup> strain was calculated at 63.53 mol% with QUAST [48], similar to the closest species *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> (64.1 mol%) [55], *B.*

*japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (63.67 mol%) [56], and *B. betae* LMG 21987<sup>T</sup> (63.7 % mol%) [57].

In order to estimate the intraspecific variability, CNPSo 3448<sup>T</sup>, CNPSo 3394 and CNPSo 3442 fingerprintings were obtained by the analysis of BOX-PCR, using BOX-A1R primer [58], following the conditions described by Kaschuk *et al.* [59]. The profiles were analysed using the Bionumerics software (version 7.6, Applied Mathematics). For the cluster comparison, a similarity dendrogram was reconstructed, using the UPGMA algorithm [60] and the Jaccard coefficient [61], with a tolerance of 3 %. The dendrogram pointed out high intraspecific diversity, with the CNPSo strains sharing only 56 % to 72 % similarity to each other and being very distinct from the closest species *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> (Fig. S9).

## PHYSIOLOGY AND CHEMOTAXONOMY

Morpho-physiological properties were determined and compared between the CNPSo strains and the closest species *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup>, *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> and *B. betae* LMG 21986<sup>T</sup>. Unless indicated, tests were performed on modified-YMA medium at 28 °C. Colony morphology and acid/alkaline reaction on modified-YMA containing Congo red and bromothymol blue, respectively, were evaluated after 7 days of growth. The ability to grow on Luria–Bertani (LB) medium, and on modified-YMA containing 1 % NaCl, or at 37 °C, or at pH 4.0 and pH 9.0 were evaluated as described before [62]. Tolerance of ampicillin (10 µg), bacitracin (0.04 U), cefuroxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), nalidixic acid (30 µg), neomycin (30 µg), penicillin (10 U), tetracycline (30 µg), streptomycin (10 µg) and erythromycin (15 µg) was examined by the disc-diffusion technique on modified-YMA medium. Urease activity was evaluated by growth on modified-YMA containing 2 % urea and phenol red as indicator. Carbon source utilization was evaluated using the API 50CH kit platform (bioMérieux), according to the manufacturer's instructions and the basal medium used was modified-YM minus mannitol, with bromothymol blue as indicator of the pH reaction. All tests were performed in triplicate. Table 3 shows only the results that had some difference between CNPSo 3448<sup>T</sup> and the closest type strains. When all results were positive, negative or neutral between CNPSo 3448<sup>T</sup> and the closest type species, not been able to distinguish them, they are not shown.

The fatty acid profiles of the CNPSo strains were detected by automated gas chromatography analytical system. The fatty acid results were identified and quantified based on the TSBA6 6.10 database by Sherlock Microbial Identification System version 6.1 (MIDI) [63]. The fatty acids detected in CNPSo 3448<sup>T</sup> were C<sub>16:0</sub> and summed feature 8, represented by C<sub>18:1</sub>ω6c/C<sub>18:1</sub>ω7c (Table S4), consistent with other *Bradyrhizobium* species [23, 31, 64].

To confirm the symbiotic properties and to investigate the host range of CNPSo strains, nodulation assays were performed in Leonard jars with *C. fasciculata*, the primary host

legume of the CNPSo isolates, on the promiscuous Papilionoid siratro (*Macroptilium atropurpureum*, and on soybean (*Glycine max* L.; commercial cultivar BRS 1003). Liquid cultures used as inoculants were adjusted to the same cell concentration by optical density ( $OD_{600}=0.9$ ). After 30 days of plant growth, CNPSo strains were able to form effective indeterminate nodules, with internal pink colour on *C. fasciculata* (Fig. 4). The CNPSo strains were also able to effectively nodulating with siratro, forming determinate nodules (Fig. 4), but did not nodulate soybean. It is interesting that *B. arachidis* CCBAUT 051107<sup>T</sup>, the closest species on the *nodC* phylogeny (Fig. 3), also did not nodulate soybean according to [65].

Using a polyphasic approach encompassing phylogenetic, genotypic and phenotypic data, the results confirmed that the CNPSo 3448<sup>T</sup>, CNPSo 3394, and CNPSo 3442 strains belongs to a novel *Bradyrhizobium* species, for which the name *Bradyrhizobium niftali* sp. nov. is proposed, with CNPSo 3448<sup>T</sup> strain indicated as the type strain.

## DESCRIPTION OF *BRADYRHIZOBIUM NIFTALI* SP. NOV.

*Bradyrhizobium niftali* (nif.ta'li. N.L. gen. n. *niftali*, arbitrary name formed from the acronym NifTAL–Nitrogen-Fixation in Tropical Agricultural Legumes, of the University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN).

Cells are Gram-stain-negative, aerobic and non-spore-forming. After 7 days of growth at 28 °C on modified-YMA containing Congo red, the colonies have light pink colour, average diameter of 0.95 mm, irregular shape, flat elevation, wavy border, smooth surface, are opaque and produce little mucus with gummy consistency. Optimal growth occurs on modified-YMA at pH 6.8–7.0 and at 28 °C. The strains produce alkaline reaction on modified-YMA, visually observed in the presence of bromothymol blue. They are unable to grow on solid LB medium, on modified-YMA containing 1 % NaCl and on modified-YMA incubated at 37 °C, but growth is observed at pH 4.0 and pH 9.0 on modified-YMA at 28 °C. The strains are urease-positive. They are sensitive to (per disc) erythromycin (15 µg), cefuroxime (30 µg), ampicillin (10 µg), streptomycin (10 µg) and tetracycline (30 µg), moderately sensitive to neomycin (30 µg) and tolerant to chloramphenicol (30 µg), penicillin G (10 U), nalidixic acid (30 µg) and bacitracin (0.04 U). The bacteria use the following compounds as carbon sources: glycerol, D-arabinose, L-arabinose, L-xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, dulcitol, N-acetylglucosamine, aesculin ferric citrate, sucrose, starch, glycogen, D-lyxose, D-fucose, L-fucose, potassium gluconate, potassium 2-keto-gluconate and potassium 5-ketogluconate. The bacteria weakly use D-ribose, D-xylose, D-adonitol, methyl β-D-xylopyranoside, D-galactose, L-sorbose, D-mannitol, D-sorbitol, arbutin, maltose, trehalose, insulin, melezitose, raffinose, xylitol, gentiobiose, turanose, D-arabitol and L-arabitol and do not grow in the presence of erythritol, inositol, methyl α-D-mannopyranoside, methyl α-D-

glucopyranoside, amygdalin, salicin, cellobiose, lactose, melibiose and D-tagatose. The strains produce effective nitrogen-fixing nodules on *Chamaecrista fasciculata* and *Macroptilium atropurpureum*, but do not nodulate *Glycine max*.

The type strain CNPSo 3448<sup>T</sup> (=USDA 10051<sup>T</sup>=U687<sup>T</sup>=CL 40<sup>T</sup>) was isolated from a nodule of *Chamaecrista fasciculata* in the USA. The DNA G+C content of strain CNPSo 3448<sup>T</sup> is 63.53 mol%.

### Funding information

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

### Acknowledgements

M.S. K. acknowledges an MSc fellowship from CNPq (Brazilian National Research Council), M.C.O. Urquiaga an MSc fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - Finance Code 001), and J.R.M. D. and R.A. R. fellowships from CNPq. The authors acknowledge Dr Maria do Carmo Catanho Pereira Lyra (IPA, Brazil) and Ligia Maria Oliveira Chueire (Embrapa Soja) for help during several steps of this study, Tyson Vorderstrasse and Kelsey Goforth (Biozyme Inc.) for their enthusiastic support in the research, Dr Itamar S. Melo and Juliane Fontana (Embrapa Meio Ambiente, Brazil) for help with the fatty acid analyses, and Dr Sergio Miana de Faria (Embrapa Agrobiologia, Brazil) for sending *Chamaecrista* seeds. Authors thank Dr Aharon Oren (Hebrew University of Jerusalem) for help with the specific epithet proposal of this species.

### Conflicts of interests

The authors declare that there no conflicts of interests.

### References

- Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martínez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Rosenberg E, DeLong E, Stackebrandt E, Lory S, Thompson F et al. (editors). *The Prokaryotes: Prokaryotic physiology and biochemistry*, 4th ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. pp. 427–451.
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ. Bacterial associations with legumes. *CRC Crit Rev Plant Sci* 2015;34:17–42.
- Schultze M, Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* 1998;32:33–57.
- Velazquez E, R. Silva L, Peix A. Legumes: a healthy and ecological source of flavonoids. *Curr Nutr Food Sci* 2010;6:109–144.
- LPWG. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 2017;66:44–77.
- Faria SM, Franco AA, Jesus RM, Menandro Mdes, Baitello JB et al. New nodulating legume trees from south-east Brazil. *New Phytol* 1984;98:317–328.
- Diabate M, Munive A, de Faria SM, Ba A, Dreyfus B et al. Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African tropical rainforest and inoculation response of native species useful in reforestation. *New Phytol* 2005;166:231–239.
- Sprent JI, Ardley J, James EK. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol* 2017; 215:40–56.
- Irwin HS, Barneby RC. Notes on the generic status of *Chamaecrista* Moench (*Leguminosae: Caesalpinioideae*). *Brittonia* 1976;28: 28–36.
- Rando JG, Zuntini AR, Conceição A, van den Berg C, Pirani JR et al. Phylogeny of *Chamaecrista* ser. *Coriaceae* (Leguminosae) unveils a lineage recently diversified in Brazilian campo rupestre vegetation. *Int J Plant Sci* 2015;177.

11. Sprent JI, Ardley JK, James EK. South African Journal of Botany From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African J Bot. South African Association of Botanists* 2013;89:31–41.
12. Naisbitt T, James EK, Sprent JI. The evolutionary significance of the legume genus *Chamaecrista*, as determined by nodule structure. *New Phytol* 1992;122:487–492.
13. Doyle JJ. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Mol Plant Microbe Interact* 2011;24:1289–1295.
14. Moulin L, Béna G, Boivin-Masson C, Stepkowski T. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol Phylogenet Evol* 2004;30:720–732.
15. Parker MA, Kennedy DA. Diversity and relationships of bradyrhizobia from legumes native to eastern North America. *Can J Microbiol* 2006;52:1148–1157.
16. Lafay B, Burdon JJ. Molecular diversity of legume root-nodule bacteria in Kakadu National Park, Northern Territory, Australia. *PLoS One* 2007;2:e277–5.
17. Santos JM, Casaes Alves PA, Silva VC, Kruschewsky Rhem MF, James EK et al. Diverse genotypes of *Bradyrhizobium* nodulate herbaceous *Chamaecrista* (Moench) (Fabaceae, Caesalpinioideae) species in Brazil. *Syst Appl Microbiol* 2017;40:69–79.
18. Rathi S, Tak N, Bissa G, Chouhan B, Ojha A et al. Selection of *Bradyrhizobium* or *Ensifer* symbionts by the native Indian caesalpinoid legume *Chamaecrista pumila* depends on soil pH and other edaphic and climatic factors. *FEMS Microbiol Ecol* 2018;94:1–17.
19. Büniger W, Grönemeyer JL, Sarkar A, Reinhold-Hurek B. *Bradyrhizobium ripae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of wild legumes in Namibia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; 68:3688–3695.
20. Morris JB. Showy partridge pea [*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene] with potential for cultivation as a multi-functional species in the United States. *Genet Resour Crop Evol* 2012;59:1577–1581.
21. Hungria M, O'Hara GW, Zilli JE, Araujo RS, Deaker R et al. Isolation and growth of rhizobia. In: Howieson JG and Dilworth MJ (editors). *Working with Rhizobia*. Canberra: Australian Centre for International Agriculture Research (ACIAR); 2016. pp. 39–60.
22. Somasegaran P, Hoben HJ. *Handbook for Rhizobia*. New York: Springer Verlag; 1994. ISBN 978-1-4613-8377-2.
23. Delamuta JR, Ribeiro RA, Araújo JL, Rouws LF, Zilli JÉ et al. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:3078–3087.
24. Delamuta JRM, Menna P, Ribeiro RA, Hungria M. Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. *Syst Appl Microbiol* 2017;40:254–265.
25. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792–1797.
26. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 2010;27:221–224.
27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
28. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
29. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.
30. Menna P, Barcellos FG, Hungria M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:2934–2950.
31. Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E et al. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63: 3342–3351.
32. Helene LC, Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Rogel MA et al. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4441–4448.
33. Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Parma MM, Melo IS et al. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4424–4433.
34. Helene LCF, Delamuta JRM, Ribeiro RA, Hungria M. *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:1827–1834.
35. Willems A, Munive A, de Lajudie P, Gillis M. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA–DNA hybridizations. *Syst Appl Microbiol* 2003;26:203–210.
36. Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Seki T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:1416–1429.
37. Wang JY, Wang R, Zhang YM, Liu HC, Chen WF et al. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:616–624.
38. Zhang YM, Li Y, Chen WF, Wang ET, Sui XH et al. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:1951–1957.
39. Lasse Grönemeyer J, Reinhold-Hurek B, Hurek T. *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4886–4894.
40. Grönemeyer JL, Hurek T, Büniger W, Reinhold-Hurek B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:62–69.
41. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahall DR et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461–466.
42. Glaeser SP, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol* 2015;38:237–245.
43. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T et al. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:733–739.
44. Durán D, Rey L, Mayo J, Zúñiga-Dávila D, Imperial J et al. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of *Lima bean* (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:2072–2078.
45. Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena MH, Rivas R, Martínez-Molina E et al. Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: Zaidi A, Khan MS and Musarrat J (editors). *Microbes for Legume Improvement*, 2nd ed. Cham: Springer; 2017. pp. 1–43p..
46. Menna P, Hungria M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61: 3052–3067.
47. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29: 1072–1075.
48. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ et al. The SEED and the Rapid annotation of microbial genomes using

- subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 2014;42:D206–D214.
49. Rosselló-Móra R, Amann R. Past and future species definitions for bacteria and Archaea. *Syst Appl Microbiol* 2015;38:209–216.
  50. 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.
  51. Mahato NK, Gupta V, Singh P, Kumari R, Verma H et al. Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek* 2017;110:1357–1371.
  52. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19126–19131.
  53. Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *Peer J Prepr*;2016:e1900v1.
  54. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013;14:60–14.
  55. Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 2002;9:189–197.
  56. Kaneko T, Maita H, Hirakawa H, Uchiike N, Minamisawa K et al. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6T. *Genes* 2011;2:763–787.
  57. Rivas R, Willems A, Palomo JL, García-Benavides P, Mateos PF et al. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1271–1275.
  58. Versalovic J, Schneider M, de BFJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 1994;5:25–40.
  59. Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS, Campo RJ. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology* 2006;32:210–220.
  60. Sneath P, Sokal R. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: Freeman; 1973. pp. 573.
  61. Jaccard P. The distribution of the flora in the alpine zone.1. *New Phytol* 1912;11:37–50.
  62. Hungria M, Chueire Lígia Maria de O, Coca RG, Megías M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* 2001;33:1349–1361.
  63. MIDI. *Sherlock Microbial Identification System Operating Manual, version 4.0*. Newark: MIDI, Inc; 2001.
  64. Tighe SW, de Lajudie P, Dipietro K, Lindström K, Nick G et al. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the sherlock microbial identification system. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50 Pt 2:787–801.
  65. Wang R, Chang YL, Zheng WT, Zhang D, Zhang XX et al. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Syst Appl Microbiol* 2013;36:101–105.
  66. Jordan DC. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchananm 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., a genus of slow growing root nodule bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:378–380.
  67. Aserse AA, Woyke T, Kyrpides NC, Whitman WB, Lindström K. Draft genome sequences of *Bradyrhizobium shewense* sp. nov. ERR11<sup>T</sup> and *Bradyrhizobium yuanmingense* CCB AU 10071<sup>T</sup>. *Stand Genomic Sci* 2017;12:1–14.
  68. Yu X, Cloutier S, Tambong JT, Bromfield ES. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:3202–3207.

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

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

Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org).

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

***Bradyrhizobium niftali* sp. nov., an effective nitrogen-fixing symbiont of partridge pea [*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene], a native caesalpinoid legume broadly distributed in USA**

Milena Serenato Klepa, Maria Clara de Oliveira Urquiaga, Padma Somasegaran, Jakeline Renata Marçon Delamuta, Renan Augusto Ribeiro, 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.** Primers and amplification conditions of the genes used in this study

Primer	Sequence 5' - 3'	Gene	Cycle conditions	Reference
fD1	AGAGTTTGATCC TGGCTCAG	r16S RNA	2 min 95°C, 30 X (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C), 2 min 72°C e 5 min 72°C)	Weisburg et al. (1991)
rD1	CTTAAGGAGGTG ATCCAGCC			
FGPS 1490	TGCGGCTGGATCA	16S rRNA	3 min 94°C, 35X (1 min 94°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C e 6 min 72°C	Laguerre et al. (1996)
FGPS 130	CCTCCTTCCGGTTTCCCCATTCGG	23S rRNA		
TSglnIf	AAGCTCGAGTAC ATCTGGCTCGACGG	<i>glnII</i>	2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C), 1.5 min 72°C e 7 min 72°C	Stepkowski et al. (2005)
TSglnIr	SGAGCCGTTCCA GTCGGTGTCG			
gyrB343F	TTCGACCAGAA Y TCCTAYAAGG	<i>gyrB</i>	5 min 95°C, 5X (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 28 X (30 s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C e 5 min 72°C)	Martens et al. (2008)
gyrB1043R	AGCTTGTCTTSGTCTGCG			
TSrecAf	CAACTGCMYTG CGTATCGTCGAA GG	<i>recA</i>	2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C), 1.5 min 72°C e 7 min 72°C	Stepkowski et al. (2005)
TSrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG			
rpoB83F	CCTSATCGAGGT TCACAGAAGGC	<i>rpoB</i>	5 min 95°C, 3X (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 30 X (30s 94°C, 1 min 58°C), 1 min 72°C e 5 min 72°C	Martens et al. (2008)
rpoB1061R	AGCGTGTTGCGG ATATAGGCG			
nodCF	GTCGATTGCMRGTCAAGACTACG	<i>nodC</i>	30s 94°C, 40 X (30s 96°C, 1 min 53°C, 30s 72°C), 5 min 72°C	Laguerre et al. (2001)
nodCI	GCCAGGTCTIGTTGCGATTGCTC			
nifHF	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	<i>nifH</i>	3 min 95°C, 35 X (1 min 94°C, 45s 60°C, 2 min 72°C), 7 min 72°C	Laguerre et al. (2001)
nifHi	AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA			

**Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M. R., Charnay, M. P., Louvrier, P., Mazurier, S. I., Rigottier-Gois, L. & Amarger, N. (1996).** Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2029-2036.

**Laguerre G, Nour SM, 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* 2001;147:981-993.

**Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. & Willems, A. (2008).** Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10

housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 200-214.

**Stepkowski, T., Moulin, L., Krzyzanska, A., McInnes, A., Law, I. J. & Howieson, J. (2005).** European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and South Africa. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7041-7052.

**Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**, 697-703.

**Table S2.** Accession numbers of genomes, 16S rRNA, *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *recA*, *rpoB* and *gyrB* used in this study. NA indicates Not Available.

Strain	16S rRNA (Complete sequences)	16S rRNA (Partial sequences)	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrB</i>
<i>B. niftali</i> CNPSo 3448 <sup>T</sup>	SPQT00000000	MK673807	SPQT00000000	SPQT00000000	MK675791	MK675795	MK675800	MK675794
<i>B. niftali</i> CNPSo 3442	NA	MK673806	NA	NA	MK675790	MK675796	MK675799	MK675793
<i>B. niftali</i> CNPSo 3394	NA	MK673805	NA	NA	MK675789	MK675795	MK675798	MK675792
<i>B. tropiciagri</i> CNPSo 1112 <sup>T</sup>	AY904753.1	AY904753.1	FJ390968	FJ391008.1	FJ391048	FJ391168	HQ634909.1	HQ634890
<i>B. embrapense</i> CNPSo 2833 <sup>T</sup>	AY904773.1	AY904773.1	HQ634875	KP234519.2	GQ160500	HQ634899	HQ634910.1	HQ634891
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 <sup>T</sup>	FJ025107.1	FJ025107.1	NA	NA	KR149131.1	KR149140	KU724169.1	KR149134.1
<i>B. elkanii</i> USDA 76 <sup>T</sup>	U35000	U35000	AY386758.1	AY328392.1	AY599117.1	AY591568.1	AM295348	AM418800
<i>B. jicamae</i> PAC 68 <sup>T</sup>	AY624134	AY624134	FJ428211	JF308945.1	FJ428204	HM047133.1	HQ587647	HQ873309.1
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 <sup>T</sup>	GU433448.1	GU433448.1	GU433473.1	KF962687.1	GU433498.1	GU433522.1	JX437677.1	JX437670.1
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 <sup>T</sup>	AY624135	AY624135	FJ428208	JF308946.1	FJ428201.1	HM047130.1	HQ587648.1	HQ873310.1
<i>B. retamae</i> Ro19 <sup>T</sup>	KC247085.1	KC247085.1	FJ428208	KF896184.1	KC247108.1	KF962711.1	KF962714.1	KF896204.1
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 <sup>T</sup>	AY923031	AY923031	KF896186	AY923038	KF896169	JX943617	KP308154.1	KF896195
<i>B. icense</i> LMTR 13 <sup>T</sup>	KF896156	KF896156	NA	NA	KF896175	JX943615	NA	KF896201
<i>B. valentinum</i> LmjM3 <sup>T</sup>	JX514883.2	JX514883.2	NA	NA	JX518575	JX518589.2	NA	LLXX01000044.1
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	KF114645.1	KF114645.1	NA	NA	KF114693.1	KF114669.1	MG811654.1	KF114717.1
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 <sup>T</sup>	KJ818096.1	KJ818096.1	NA	NA	KJ818099.1	KJ818112.1	MG811655.1	KJ818102.1
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 <sup>T</sup>	NC_004463.1	NC_004463.1						
<i>B. canariense</i> LMG 22265 <sup>T</sup>	AJ558025.1	AJ558025.1	AY386739.1	AY923047.1	AY386765.1	FM253177	FM253263	FM253220
<i>B. betae</i> LMG 21987 <sup>T</sup>	AY372184	AY372184	FM253129	AY923046.1	AB353733.1	AB353734.1	FM253260	FM253217
<i>B. japonicum</i> USDA 6 <sup>T</sup>	X66024	X66024	AM168320	AM168362	AF169582	AM182158	AM295349	AM418801
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 <sup>T</sup>	NR 118648.1	HQ231274.1	HQ231289.1	KF962684.1	HQ231301.1	HQ231270.1	JX437676.1	JX437669.1
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 <sup>T</sup>	X66025.1	X66025.1	FM253153.1	KF962685.1	HM047121.1	FM253196.1	FM253282.1	FM253239.1
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 <sup>T</sup>	JQ619230.1	JQ619230.1	JQ619232.1	KF962688.1	JQ619233.1	JQ619231.1	KF962713.1	KF962697.1

<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup>	AF193818	AF193818	AY386760.1	AY923039.1	AY386780.1	AM168343	FM253269	FM253226
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 <sup>T</sup>	AF208513	AF208513	AY386752.1	AY923041.1	AY386775.1	AY591564.1	FM253266	FM253223
<i>B. iriomotense</i> EK05 <sup>T</sup>	AB300992	AB300992	AB300994.1	JF308944.1	AB300995	AB300996	HQ587646.1	AB300997
<i>B. cytisi</i> CTAW11 <sup>T</sup>	EU561065.2	EU561065.2	GU001613.1	JQ945184.1	GU001594.1	GU001575.1	JN186288.1	JN186292.1
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 <sup>T</sup>	HQ231463.1	HQ231463.1	HQ231682.1	JX437665.1	HQ231639.1	HQ231595.1	HQ587647.1	JX437672.1
<i>B. rifense</i> CTAW71 <sup>T</sup>	EU561074.2	EU561074.2	GU001617.1	JQ945187.1	GU001604.1	GU001585.1	KC569468.1	KC569466.1
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 <sup>T</sup>	HM107167.1	HM107167.1	HM107217.1	JX437668.1	HM107251.1	HM107233.1	JX437682.1	JX437675.1
<i>B. ingae</i> BR 10250 <sup>T</sup>	KF927043.1	KF927043.1	KY753593.1	KF927055.1	KF927067.1	KF927061.1	KF927073.1	KF927079.1
<i>B. manausense</i> BR 3351 <sup>T</sup>	HQ641226.2	HQ641226.2	NA	NA	KF785986.1	KF785992.1	KF785998.1	KF786000.1
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 <sup>T</sup>	NZ_LFJC01000003.1	KF927051.1	NA	NA	KJ661700.1	KJ661714.1	KF983829.1	KJ661707.1
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 <sup>T</sup>	JQ796661.2	JQ796661.2	NA	NA	JX277110.1	JX277144.1	NA	KP420022.1
<i>B. ottawaense</i> OO99 <sup>T</sup>	JN186270.1	JN186270.1	HQ455212.1	JF308816.1	HQ587750.1	HQ587287.1	HQ587518.1	HQ873179.1
<i>B. subterraneum</i> 58-2-1 <sup>T</sup>	KP308152.1	KP308152.1	KX661391.1	KP308157.1	KM378484.1	KM378397	KM378349.1	KX661396.1
<i>B. vignae</i> 7-2 <sup>T</sup>	NZ_RDQF00000000.1	KP899563.1	NA	NA	KM378443.1	KM378374.1	KM378308.1	KX683216.1
<i>B. kavangense</i> 14-3 <sup>T</sup>	KP899562.1	KP899562.1	KY753592.1	KR259949.1	KM378446.1	KM378399.1	KM378311.1	KX661397.1
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 <sup>T</sup>	CP030052.1	KC508867.1	KC508916.1	KC508964.1	KC509023.1	KC509269.1	KC509318.1	KC509072.1
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 <sup>T</sup>	NZ_CP022220.1	KC508877.1	KC508926.1	KC508974.1	KC509033.1	KC509279.1	KC509328.1	KC509082.1
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 <sup>T</sup>	NZ_LVEM01000003.1	KU724142	NA	NA	KU724148	KU724163	KU724166	KU724151
<i>B. lupini</i> USDA 3051 <sup>T</sup>	KM114861.1	KM114861.1	NA	NA	KM114862.1	KM114866.1	NA	NA
<i>B. centrosemae</i> A9 <sup>T</sup>	KC247115.1	KC247115.1	NA	NA	KX012940.1	KC247145.1	NA	NA
<i>B. americanum</i> CMVU44 <sup>T</sup>	KU991833.1	KU991833.1	NA	NA	KX012942.1	KC247141.1	NA	NA
<i>B. cajani</i> AMBPC1010 <sup>T</sup>	KY349447.1	KY349447.1	NA	NA	KY349442.1	KY349440.1	NA	NA
<i>B. brasiliense</i> UFLA03-321 <sup>T</sup>	MPVQ01000094.1	KF311068.2	KF452730.1	KF452791.1	MPVQ00000000	KT793142.1	KF452879.1	KF452827.1
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399 <sup>T</sup>	FJ025102.1	FJ025102.1	NA	NA	KX690621.1	KX690615.1	NA	KX690623.1
<i>B. centrolonii</i> BR 10245 <sup>T</sup>	KF927049.1	KF927049.1	NA	NA	KX527991.1	KX527954.1	KF983827.3	KX528004.1

<i>B. macuxiense</i> BR 10303 <sup>T</sup>	NZ_LNCU01000039.1	KX527919.1	NA	NA	KX527995.1	KX527958.1	KX527969.1	KX528008.1
<i>B. sacchari</i> BR 10280 <sup>T</sup>	KF113091.3	KF113091.3	NA	NA	KX065099.1	KX065095.1	NA	NA
<i>B. namibiense</i> 5-10 <sup>T</sup>	KX661401.2	KX661401.2	KX661387.1	KP402058.1	KM378440.1	KM378377.1	KM378306.1	KX661393.1
<i>B. forestalis</i> INPA54B <sup>T</sup>	NZ PGVG010001	KR779520.2	NA	NA	PGVG00000000	KF452867.1	NA	KF452831.1
<i>B. algeriense</i> RST89 <sup>T</sup>	PYCM01000032.1	FJ546419.1	NA	NA	FJ264924.1	FJ264927.1	NA	NA
<i>B. shewense</i> ERR11 <sup>T</sup>	NZ_FMAI01000001.1	NZ_FMAI01000001.1	NA	NA	JQ809893.1	NZ_FMAI01000022.1	JQ810006.1	NZ_FMAI01000013.1
<i>B. ripae</i> WR4 <sup>T</sup>	MF593081.1	MF593081.1	NA	NA	MF593086.1	MF593090.1	MF593098.1	MF593094.1
<i>B. nitroreducens</i> TSA1 <sup>T</sup>	AB542368.1	AB542368.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA

**Table S3.** Nucleotide Identity (NI) between *Bradyrhizobium niftali* CNPSO strains and type strains belong to the *B. japonicum* superclade, based on the sequences of single 16S rRNA, ITS, *nifH* and *nodC* genes, four single and concatenated housekeeping genes (*glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*) and six concatenated (+*atpD*, +*dnaK*) genes. NA indicates Not Available.

	Nucleotide Identity (%)										
	Ribosomal			Symbiotic genes		Housekeeping genes				MLSA	
	16S (Complete sequence)	16S (Partial sequence)	ITS	<i>nifH</i>	<i>nodC</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	4 genes	6 genes
Between CNPSO strains	NA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	NA
Between CNPSO strains and:											
<i>B. diazoefficiens</i>	100	100	84	90.6	90.6	98.2	98.1	95	97.2	97.3	83
<i>B. japonicum</i>	99.3	99.7	95	90.6	90.6	96.8	95.8	93.8	93.1	95.1	81.2
<i>B. betae</i>	99.4	100	90.2	NA	NA	96.6	93.8	94.1	92.9	94.5	80.6
<i>B. stylosanthis</i>	99.3	99.4	84.4	84.7	74.8	95.6	94.5	92.5	97	94.9	NA
<i>B. canariense</i>	99.1	99.6	90.5	84.7	75.5	95.4	94.3	93	90.7	93.6	80.2
<i>B. daqingense</i>	99.6	99.8	79.1	90.6	90.6	94.2	93.6	91.1	93.7	93.3	79.9
<i>B. yuanmingense</i>	98.9	99.2	87.2	92.1	88.4	93.2	92.9	91.6	93.4	92.8	79.5
<i>B. liaoningense</i>	99.4	99.8	89.1	90.6	71.5	95.4	95.1	91.9	93.4	94.2	80.4
<i>B. iriomotense</i>	99	98.9	74.3	85.2	74.6	95.4	94	90	91	92.9	79.4
<i>B. cytisi</i>	99.2	99.3	88.5	84.2	76.7	95	93.2	91.6	93.1	93.4	79.2
<i>B. huanghuaihaiense</i>	99.4	99.4	90.3	90.6	90.6	95.8	94.2	89.7	97	94.3	80.5
<i>B. rifense</i>	99.4	99.6	91.5	83.7	75.5	95.6	94	91.9	92.3	93.7	80
<i>B. arachidis</i>	99.3	99.2	86.5	98.5	98.3	94.2	94	91.6	94.2	93.6	79.9
<i>B. ingae</i>	99.2	99	82.4	89.1	73.9	96.8	92.2	90	91	92.8	79.2
<i>B. manausense</i>	99.3	99.4	NA	85.7	75.3	93.4	92.3	91.6	94.8	93	NA
<i>B. ottawaense</i>	99.3	100	NA	90.6	90.6	95.2	95.6	92.7	93.7	94.5	80.9
<i>B. subterraneum</i>	99.3	99.6	78.8	97.5	NA	93.6	92.7	91.1	93.1	92.7	78.6
<i>B. kavangense</i>	98.6	98.7	75.2	98	94.1	93.8	94.3	91.6	94	93.6	79.8
<i>B. guangdongense</i>	99.3	99.5	NA	81.2	NA	93.2	94.7	90.5	94.2	93.3	79.3
<i>B. guangxiense</i>	99.3	99.8	NA	88.6	NA	94.4	93.2	93.3	93.4	93.6	79.9
<i>B. ganzhouense</i>	99.6	99.6	NA	84.7	74.4	97	94.7	92.2	NA	NA	NA
<i>B. vignae</i>	99.3	99.5	87.6	96.5	94.3	93.6	92.7	90.8	95	93.1	NA
<i>B. lupini</i>	98.9	99.6	92.8	NA	73.9	95	NA	92.2	NA	NA	NA
<i>B. centrosemae</i>	99.7	99.8	77.4	91.1	85.2	93.6	NA	92.7	NA	NA	NA
<i>B. americanum</i>	99.6	99.8	81.1	83.7	75.3	94.4	NA	91.1	NA	NA	NA
<i>B. cajani</i>	99	99.3	NA	NA	97.8	94.4	NA	91.6	NA	NA	NA
<i>B. sacchari</i>	99.1	99	NA	87.6	90.8	94.8	NA	91.6	NA	NA	NA
<i>B. forestalis</i>	99.2	99.2	NA	99	98.5	93.8	91.3	93	NA	NA	NA
<i>B. shewense</i>	99.5	100	NA	NA	NA	95.8	96.1	91.6	93.7	94.6	NA
<i>B. nitroreducens</i>	99.6	99.8	99.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

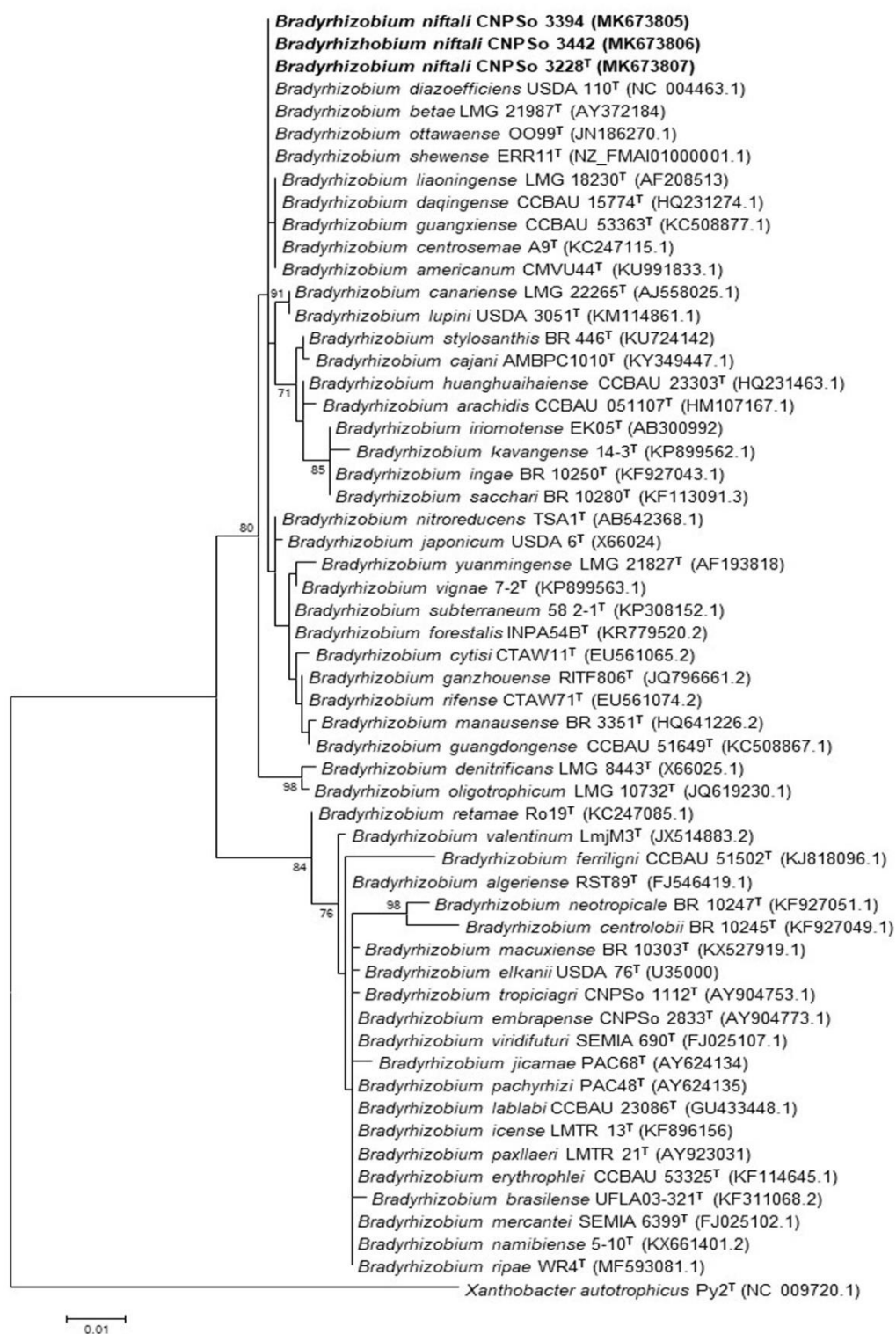
**Table S4.** Fatty acid profile (%) of *B. niftali* CNPSo 3448<sup>T</sup> grown for 5 days at 28 °C on yeast extract-mannitol agar plates. Data obtained with the MIDI system using FAME library TSBA6, according Delamuta et al. (2013).

Strains: 1. *B. niftali* CNPSo 3448<sup>T</sup>; 2. *B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup>; 3. *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>; 4. *B. betae* LMG 21987<sup>T</sup>.

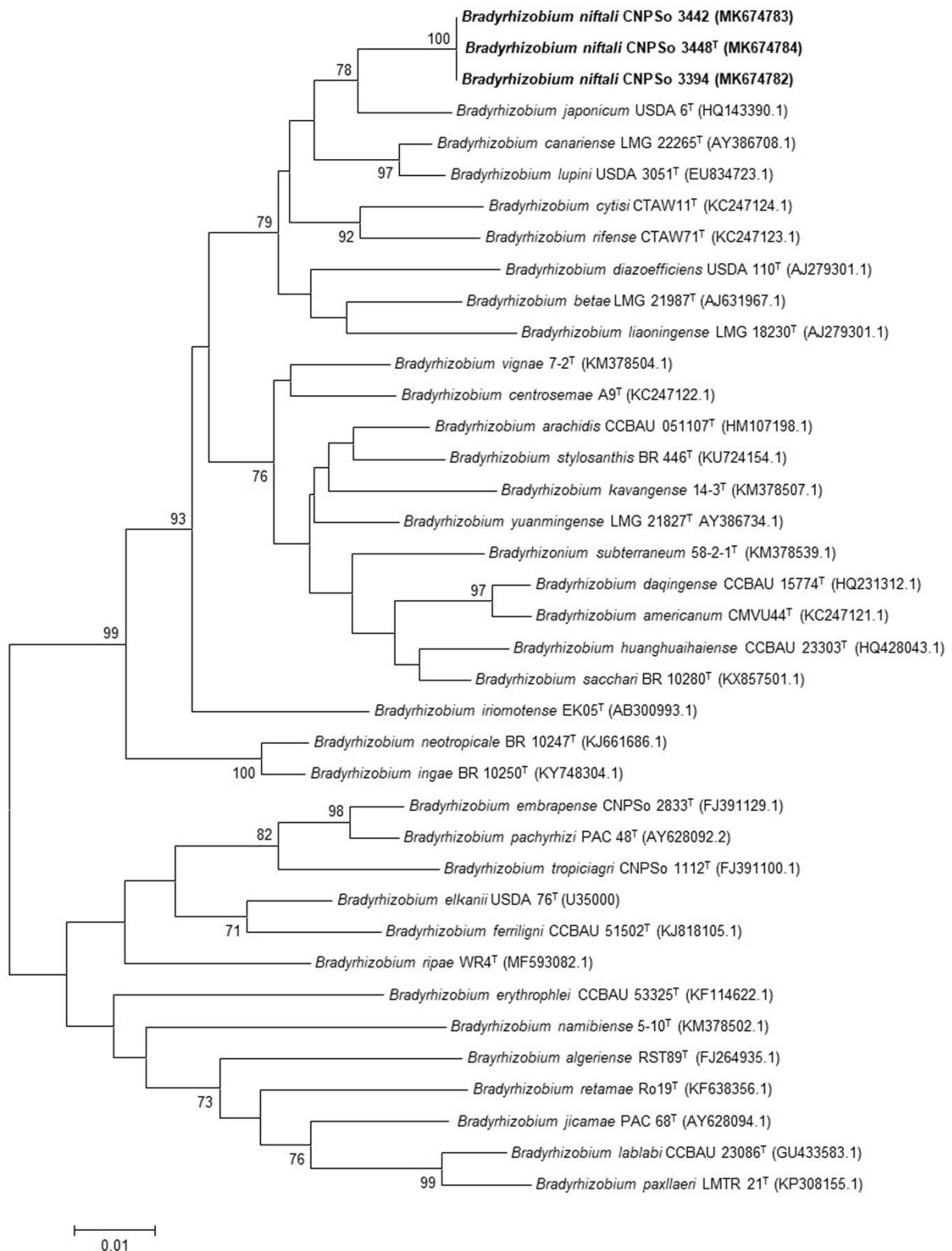
	<b>1</b>	<b>2<sup>□</sup></b>	<b>3<sup>□</sup></b>	<b>4</b>
C16:0	13.65	14.09	13.05	14.88
C16:1 ω5c			3.63	
C18:0			0.79	
C18:1 ω7c 11-methyl			6.65	10.81
Summed features				
3 <sup>#</sup>			1.07	
8 <sup>*</sup>	86.35	85.91	74.81	74.30

<sup>□</sup> Data obtained in the same laboratory and conditions by Delamuta et al. (2013)

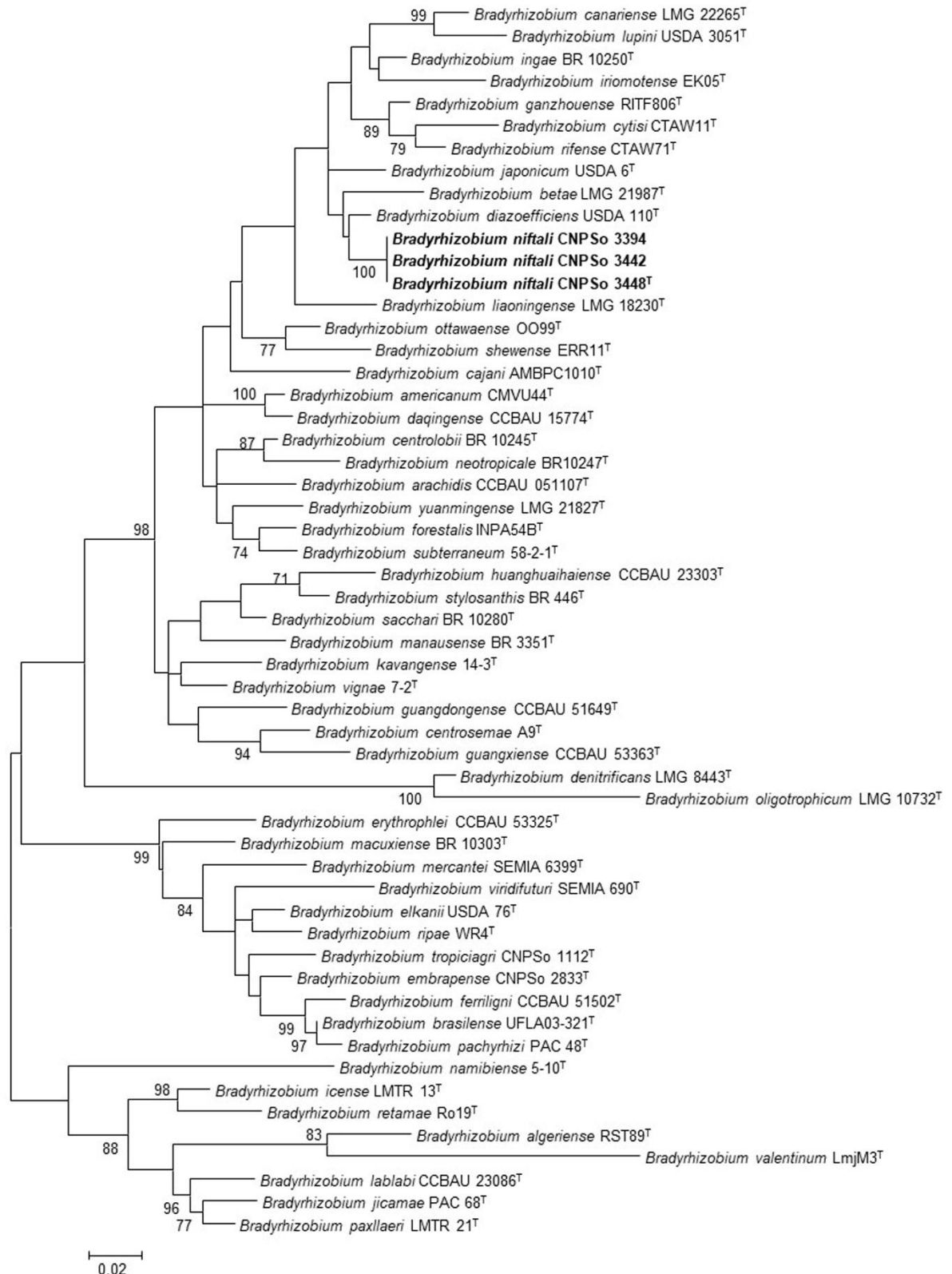
**Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M.** Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63(9):3342–51.



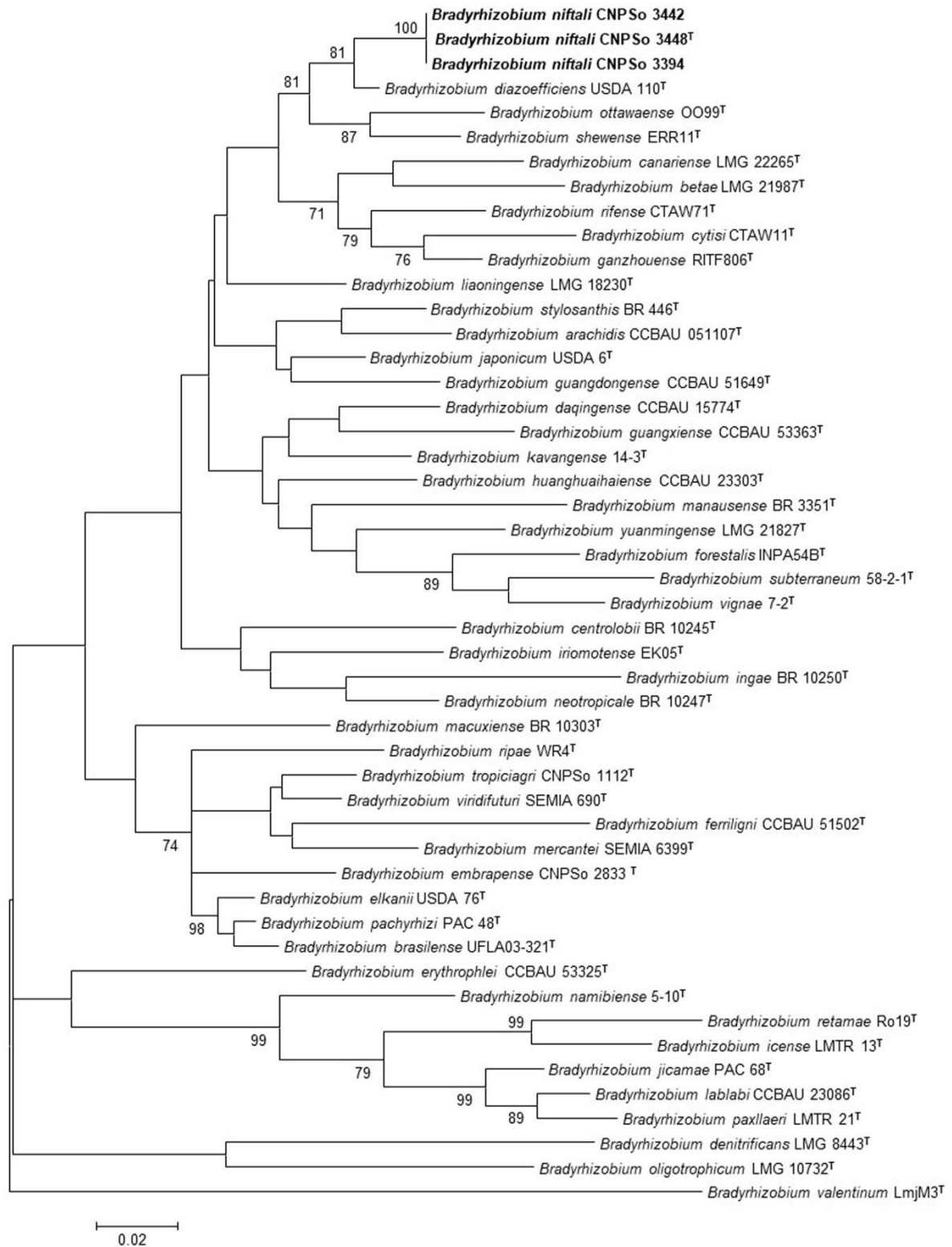
**Figure S1.** Maximum likelihood phylogeny based from 16S rRNA alignment (947 bp) between *B. niftali* sp. nov. strains and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in parentheses. The novel species is shown in bold. The ML tree was obtained using the T92: Tamura 3-Parameter model +G model by MEGA v. 6. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 was used as outgroup. Bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions.



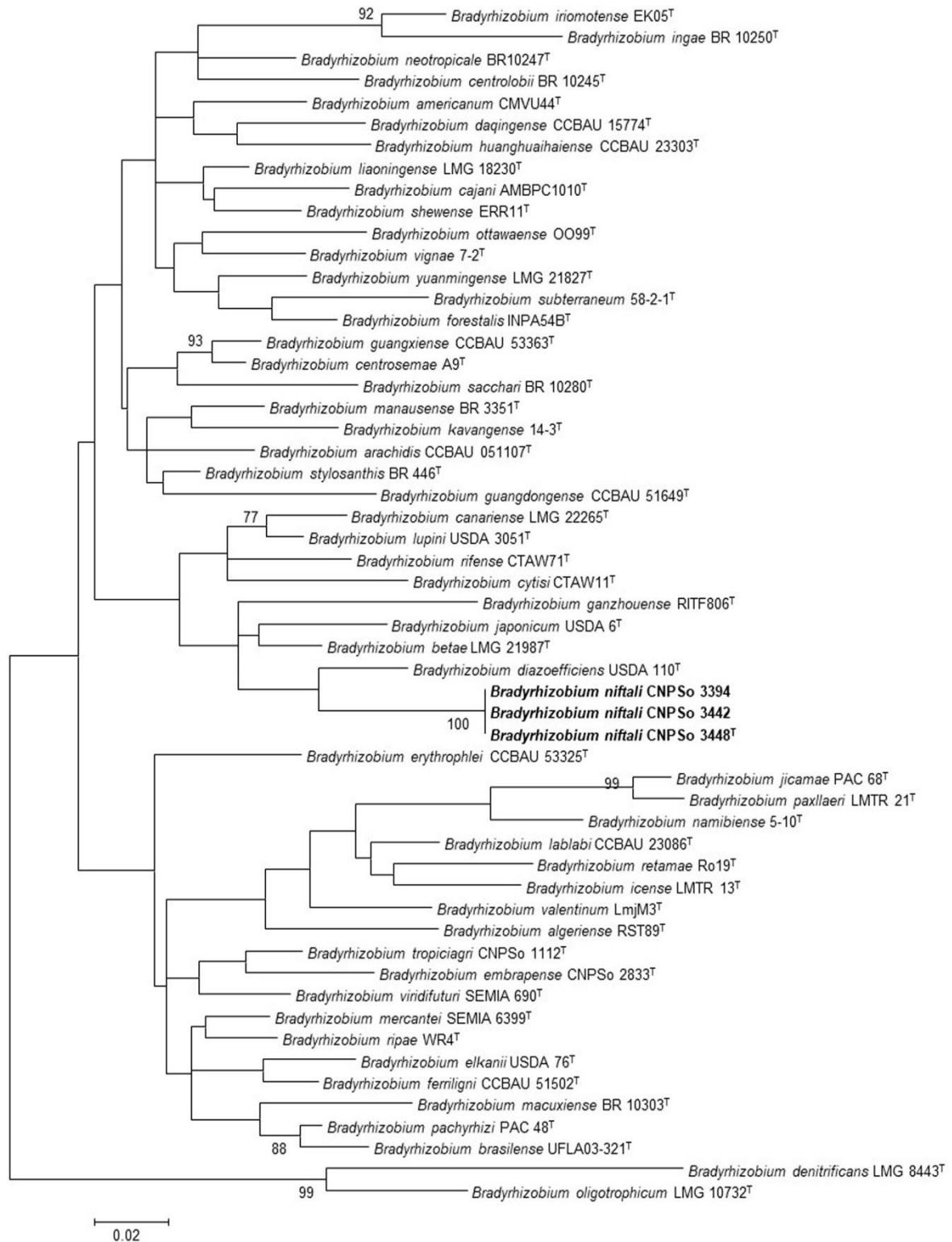
**Figure S2.** Neighbor Joining (NJ) phylogeny based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer (ITS) alignment (915 bp) between *B. niftali* strains and other *Bradyrhizobium* species. The NJ tree was obtained based on matrix of uncorrected distances. Bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. The scale bar indicates one substitution per 100 nucleotide positions. Accession numbers are shown in parentheses.



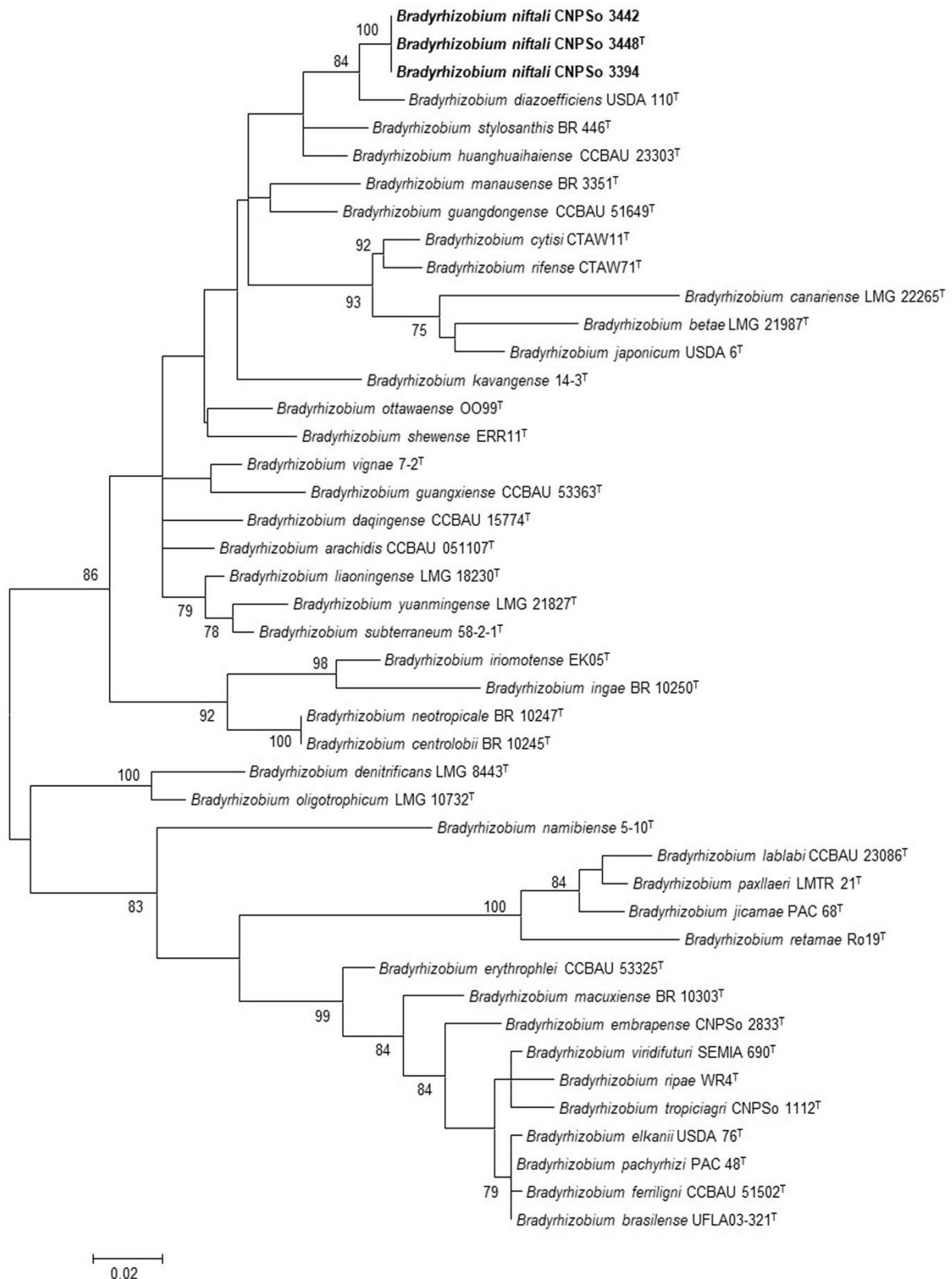
**Figure S3.** Maximum likelihood phylogeny based from *glnII* alignment (505 bp) between *B. niftali* sp. nov. strains and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in Table S2. The novel species is shown in bold. The ML tree was obtained using the T93: Tamura-Nei model +G+I model, calculated by MEGA v.6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.



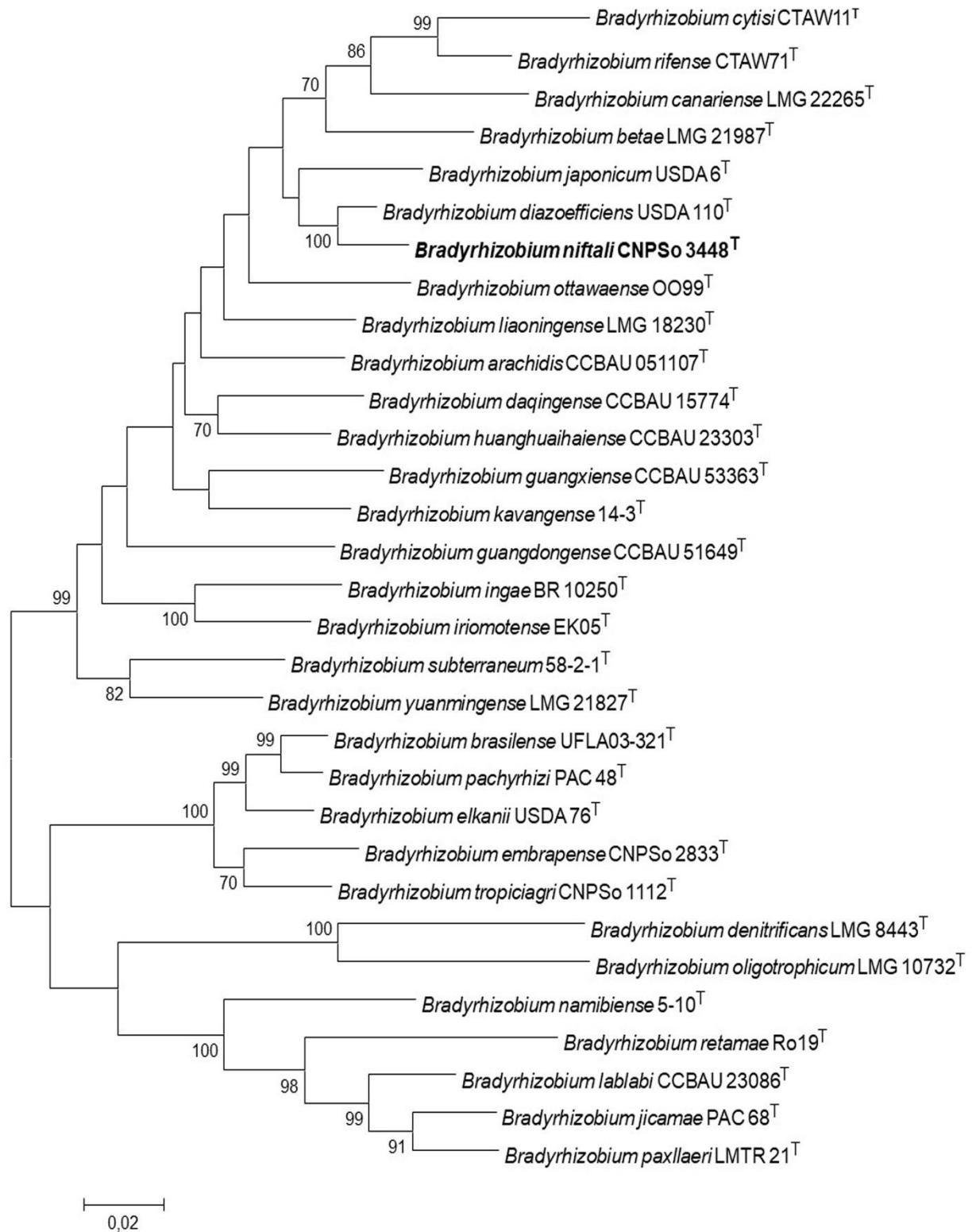
**Figure S4.** Maximum likelihood phylogeny based from *gyrB* alignment (552 bp) between *B. niftali* sp. nov. strains and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in Table S2. The novel species is shown in bold. The ML tree was obtained using the GTR: General Time Reversele model +G+I model, calculated by MEGA v.6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.



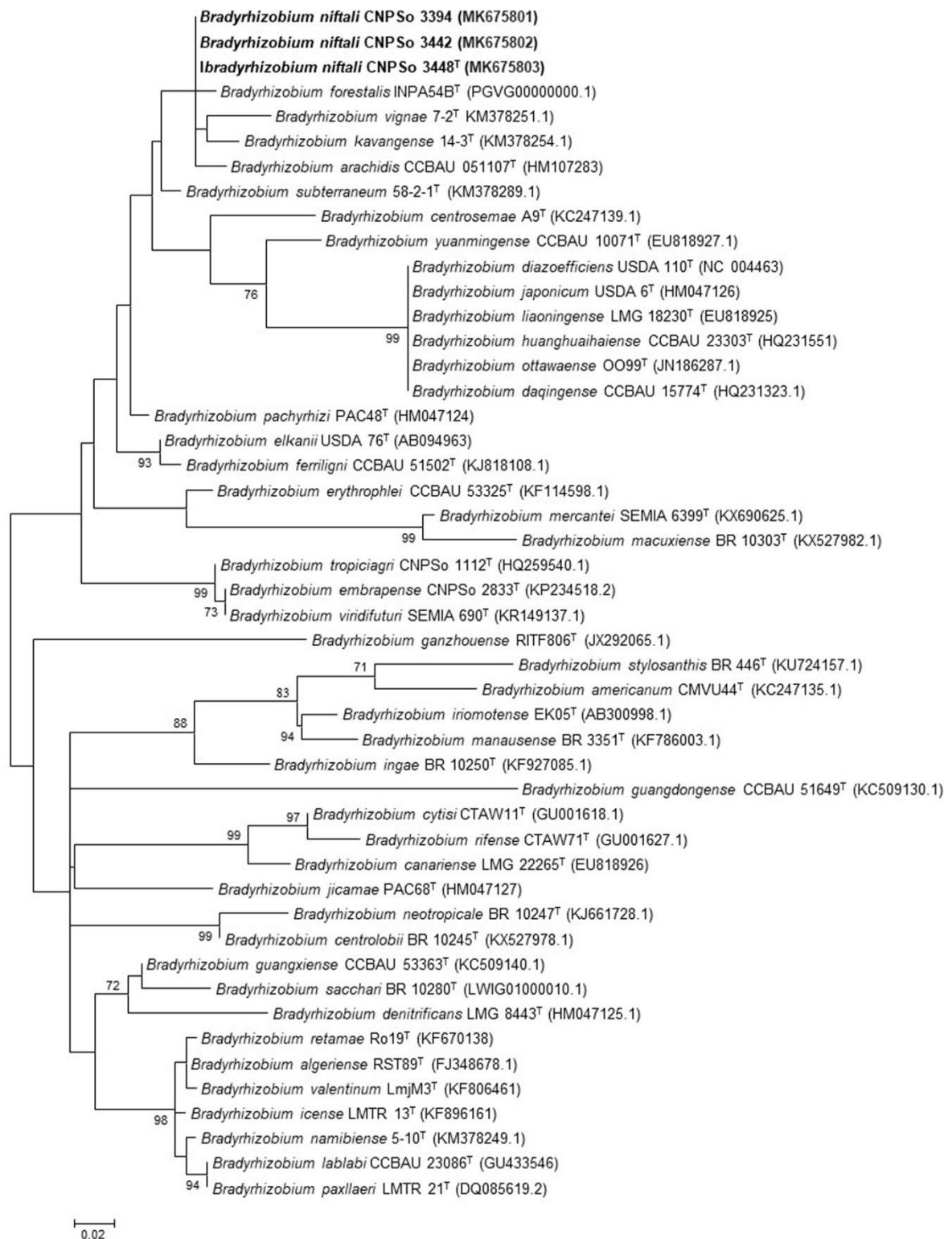
**Figure S5.** Maximum likelihood phylogeny based from *recA* alignment (360 bp) between *B. niftali* sp. nov. strains and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in Table S2. The novel species is shown in bold. The ML tree was obtained using the T92: Tamura 3-Parameter model +G+I model, calculated by MEGA v.6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.



**Figure S6.** Maximum likelihood phylogeny based from *rpoB* alignment (371 bp) between *B. niftali* sp. nov. strains and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in Table S2. The novel species is shown in bold. The ML tree was obtained using the T93: Tamura-Nei model +G+I model, calculated by MEGA v.6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.



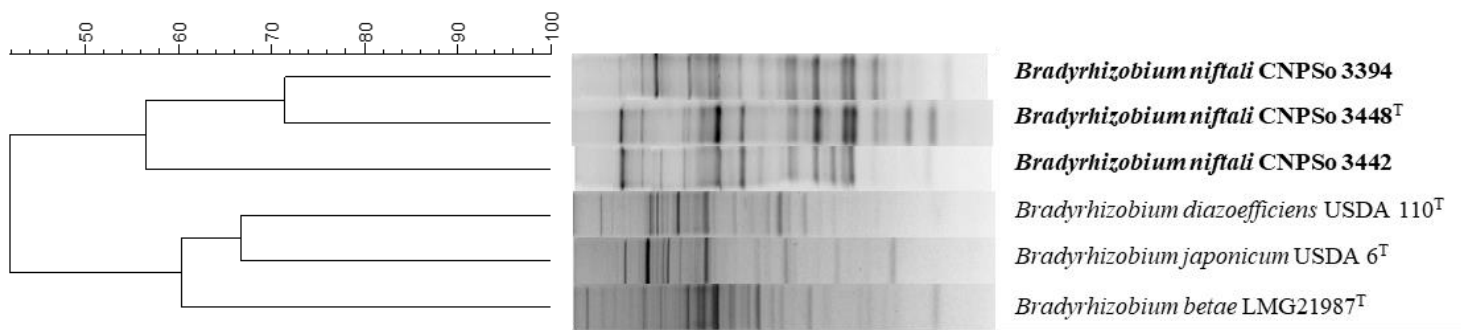
**Figure S7.** Maximum likelihood phylogeny based from alignment of the *atpD*+*dnaK*+*glnII*+*gyrB*+*recA*+*rpoB* concatenated (2438 bp) between *B. niftali* sp. nov. CNPSo 3448<sup>T</sup> and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in Table S2. The ML tree was obtained using the GTR: General Time Reversible model +G+I model by MEGA v. 6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions



**Figure S8.** Maximum likelihood phylogeny based from *nifH* alignment (203 bp) between *B. niftali* sp. nov. strains and other *Bradyrhizobium* species. Accession numbers are indicated in parentheses. The novel species is shown in bold. The ML tree was obtained using the T92: Tamura 3-Parameter model +G+I model, calculated by MEGA v.6. Only bootstrap values >70 % are indicated at the nodes. Bar indicates two substitutions per 100 nucleotide positions.

BOX-PCR

BOX-PCR



**Figure S9.** Cluster analysis of BOX-PCR products obtained from *Bradyrhizobium niftali* strains (in bold) and related species. Analysis performed in Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.6) using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) and the Jaccard coefficient with 3% of tolerance.

## 7. Considerações Finais

A simbiose entre rizóbios e leguminosas é uma das interações mais estudadas entre organismos procarióticos e eucarióticos. Atualmente, estirpes de rizóbios selecionadas têm sido largamente aplicadas em culturas de leguminosas economicamente importantes como uma alternativa sustentável e econômica ao uso de fertilizantes nitrogenados. Os benefícios da FBN em sistemas agrícolas são atribuídos a constantes esforços voltados à seleção de estirpes competitivas, eficientes e compatíveis com cada tipo de cultura, sendo que as etapas primordiais desse processo envolvem o conhecimento e a classificação adequada das espécies microbianas naturalmente existentes no solo. Deste modo, estudos relacionados à taxonomia de bactérias fixadoras de nitrogênio são imprescindíveis na ampliação do conhecimento acerca da diversidade desse grupo, tendo possibilidade de contribuir para interessantes aplicações biotecnológicas.

Apesar do vasto conhecimento acumulado acerca dos mecanismos de nodulação e fixação de nitrogênio, sabe-se que os estudos foram principalmente voltados para plantas e estirpes modelos, normalmente Papilionoideae e de interesse agrícola. Sendo assim, estudos utilizando plantas hospedeiras da subfamília basal Caesalpinioideae, como é o caso de *Chamaecrista fasciculata*, têm a possibilidade de incentivar pesquisas futuras e melhorar a compreensão acerca da evolução das leguminosas e origem da nodulação.

O presente estudo corrobora com Fonseca et al., (2012), Dos Santos et al., (2017), Andrews et al., (2017) e Rathi et al., (2018) no que diz respeito ao gênero *Bradyrhizobium* possivelmente ser o principal microssimbionte de *Chamaecrista*. A partir da análise polifásica realizada nas três estirpes isoladas de diferentes regiões geográficas nos EUA, sugere-se a descrição de uma nova espécie de *Bradyrhizobium*, na qual foi proposto o nome de *Bradyrhizobium niftali*, contribuindo para a diversidade deste relevante gênero microbiano, o qual tem sido considerado o simbionte primordial das leguminosas.