



JORDANA LUÍSA DE CASTRO

**SYMBIOTIC EFFICIENCY IN *VIGNA UNGUICULATA* AND
MIMOSA BIMUCRONATA AND GENETIC
CHARACTERIZATION OF *BRADYRHIZOBIUM* AND
PARABURKHOLDERIA STRAINS ORIGINATING FROM
SOILS OF THE QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

LAVRAS – MG

2023

JORDANA LUÍSA DE CASTRO

**SYMBIOTIC EFFICIENCY IN *VIGNA UNGUICULATA* AND *MIMOSA*
BIMUCRONATA AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *BRADYRHIZOBIUM*
AND *PARABURKHOLDERIA* STRAINS ORIGINATING FROM SOILS OF THE
QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Doutora.

Prof^ª. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

LAVRAS – MG

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Castro, Jordana Luísa de.

Symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata* and *Mimosa
bimucronata* and genetic characterization of *Bradyrhizobium* and
Paraburkholderia strains originating from soils of the Quadrilátero
Ferrífero / Jordana Luísa de Castro. - 2022.

111 p.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Rizóbios. 3. Mineração. I.
Moreira, Fatima Maria de Souza. II. Título.

JORDANA LUÍSA DE CASTRO

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA EM *VIGNA UNGUICULATA* E *MIMOSA BIMUCRONATA* E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* E *PARABURKHOLDERIA* ORIUNDAS DE SOLOS DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO

SYMBIOTIC EFFICIENCY IN *VIGNA UNGUICULATA* AND *MIMOSA BIMUCRONATA* AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *BRADYRHIZOBIUM* AND *PARABURKHOLDERIA* STRAINS ORIGINATING FROM SOILS OF THE QUADRILÁTERO FERRÍFERO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programade Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção dotítulo de Doutora.

APROVADA em 28/11/2022.

Dra. Krisle Silva
Dra. Elaine Martins da Costa
Dr. Flavio Henrique Silveira Rabelo
Dr. Edenson da Conceição Jesus

EMBRAPA
UFPI
UFLA
EMBRAPA

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

Lavras – MG

2023

A Deus, meu refúgio e fortaleza, o autor de todas as coisas possíveis e impossíveis,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades concedidas até aqui e por todas as bênçãos que recebi nesta caminhada. Esta tese só foi escrita pois Ele me sustentou e colocou soluções e pessoas que me ajudaram a tornar este sonho possível. À Ele toda honra e glória sempre.

À professora Fatima Moreira por sua humanidade, respeito e pela orientação e ensinamentos passados em todos estes anos, tornando-se muito mais que uma orientadora e fazendo muito além do seu papel. Para mim, um exemplo de profissional à qual serei eternamente grata.

Ao meu filho Arthur, que compartilhou comigo toda esta trajetória, às vezes de perto e na maioria das vezes de longe. Apesar da sua pouca idade, foi sem saber, a estrelinha que me manteve e mantém de pé, me incentivando a ultrapassar os obstáculos mais difíceis da minha vida, sempre me entregando o amor mais puro do mundo.

Aos meus pais Elpino e Maria, por acreditarem no meu sonho, pelo amor, incentivo e por todo suporte que me deram em todos os momentos, nunca mediram esforços para me ver realizando o meu sonho. Vocês são parte importante e essencial desta conquista. Ao meu irmão Braylan e minha irmã Sabrina, pelo amor, amizade e incentivo de todas as maneiras possíveis. Eu amo muito vocês.

À Silvia Longatti pela amizade, incentivo e carinho, toda minha gratidão a você e sua família por tudo o que fizeram por mim.

Às minhas amigas e grandes incentivadoras Marla, Franciane e Raquel pelo amor, alegria, momentos compartilhados e companheirismo, mesmo de longe sempre se mantiveram presentes, a nossa amizade foi e é essencial na minha vida e trajetória acadêmica. À Samanta e Renata pelo apoio e amizade em todos os momentos, vocês são especiais!

Ao Padre Adelize Moraes, pelo direcionamento, incentivo e orações.

Aos colegas do Departamento de Ciência do Solo pela amizade, ajuda e experiências compartilhadas, em especial Daniele e Priscila Rabelo, Rafael, André, Helen, Jacqueline e Osnar vocês tornaram a minha caminhada mais leve e alegre.

À todas as pessoas que contribuíram de forma direta e indireta para que este momento chegasse e graças a Deus foram tantas que fica difícil mencionar nomes aqui, mas deixo registrada a minha gratidão.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência do Solo que ao longo

destes anos foram a minha segunda casa, me fornecendo a estrutura e ensino necessários, além dos professores por quem tenho grande admiração e respeito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!!!

RESUMO

O nitrogênio (N) possui notável importância dentro dos ecossistemas. Em geral, este elemento encontra-se com baixa disponibilidade à boa parte dos organismos, sendo utilizado por parte das espécies bacterianas, conhecidas como diazotróficas. O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), pode acontecer através da simbiose entre leguminosas e rizóbios e representa uma fonte ecologicamente correta e econômica de N, pois pode reduzir possíveis impactos ambientais provocados pela utilização de fertilizantes e os custos de produção pela substituição parcial ou total destes. Sendo assim, identificar as bactérias presentes nos solos e sua capacidade de promover o crescimento vegetal é o primeiro passo para a seleção de espécies com potencial de utilização como inoculantes de leguminosas e também para a elaboração de estratégias que visem melhorar o manejo e a recuperação de áreas degradadas. Várias estirpes de diazotróficas foram previamente isoladas de solos de diferentes fitofisionomias do Quadrilátero ferrífero usando *Vigna unguiculata* como planta isca. Dentre essas, destacaram-se estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia*. Assim, os objetivos deste trabalho foram: (1) avaliar estirpes bacterianas oriundas de solos do Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais dos gêneros *Bradyrhizobium* (23) e *Paraburkholderia* (46), quanto à sua eficiência em promover o crescimento e nodular respectivamente *Vigna unguiculata* e *Mimosa bimucronata*; (2) Verificar o posicionamento das estirpes em estudo em relação às espécies tipo já descritas com base nas sequências parciais do gene rRNA 16S e sequenciamento dos genomas de estirpes representativas de grupos obtidos por sequências parciais do gene rRNA 16S; (3) Identificar possíveis novas espécies dentre as estirpes analisadas. Inicialmente, foram implantados experimentos em casa de vegetação, inoculando as estirpes em plantas de *Vigna unguiculata* e *Mimosa bimucronata*. Posteriormente o teor de clorofila presente nas folhas das plantas e os parâmetros de eficiência simbiótica e nodulação foram avaliados. Foram construídas árvores filogenéticas utilizando as sequências parciais do gene 16S rRNA das espécies tipo de cada gênero e das estirpes em estudo. Em seguida, foi realizado o sequenciamento do DNA genômico das estirpes representativas obtidos por sequências parciais do gene rRNA 16S que indicavam ser possivelmente novas espécies, e a identidade média de nucleotídeos calculada (ANI) calculada, para comparação do genoma das estirpes analisadas com o genoma das espécies já descritas. As estirpes de *Bradyrhizobium* foram eficientes em *Vigna unguiculata* e algumas delas representam novas espécies. Com relação às estirpes de *Paraburkholderia*, a maioria foi capaz de nodular as plantas de *Mimosa bimucronata*, e a estirpe UFLA 03-690 se destacou por apresentar os melhores resultados.

Palavras chave: canga cerrado mineração *Paraburkholderia* fixação biológica de nitrogênio *Bradyrhizobium*

ABSTRACT

Nitrogen (N) has notable importance within ecosystems. In general, this element is inaccessible to most organisms, being used by bacterial species, known as diazotrophs. The process of biological nitrogen fixation (BNF) can occur through symbiosis between legumes and rhizobia and represents a clean and economical source of N, as it can reduce possible environmental impacts caused by the use of fertilizers and production costs by partial or total of these fertilizers. Therefore, identifying the bacteria present in soils and their ability to promote plant growth is the first step towards selecting species with potential for use as leguminous inoculants and also towards the development of strategies aimed at improving the management and recovery of degraded areas. Several strains of diazotrophs were isolated from soils of different phytophysiognomies of the Iron Quadrangle using *Vigna unguiculata* as a bait plant, among which strains of the genera *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia* stood out. Iron Quadrangle of Minas Gerais of the genera *Bradyrhizobium* (23) and *Paraburkholderia* (46), regarding their efficiency in promoting growth and nodularity respectively *Vigna unguiculata* and *Mimosa bimucronata*; (2) Verify the positioning of the strains under study in relation to the type species already described based on partial sequences of the 16S rRNA gene and genome sequencing of representative strains of groups obtained by partial sequences of the 16S rRNA gene; (3) Identify possible new species among the analyzed strains. Initially, experiments were implemented in a greenhouse, inoculating the strains in plants of *Mimosa bimucronata* and *Vigna unguiculata*. Subsequently, the chlorophyll content present in the leaves of the plants and the parameters of symbiotic efficiency and nodulation were evaluated. Phylogenetic trees were built using the partial sequences of the 16S rRNA gene of the type species of each genus and strains under study. Then, the genomic DNA sequencing of representative strains of phylogenetic groups obtained by partial sequences of the 16S rRNA gene that indicated possibly new species was carried out, and the Average Nucleotide Identity (ANI) calculated, for comparison of the genome of the strains analyzed with the genome of the species already described. Most of the *Bradyrhizobium* strains were efficient on *Vigna unguiculata* and some of them represent new species. Regarding the *Paraburkholderia* strains, most were able to nodulate *Mimosa bimucronata* plants, and the UFLA 03-690 strain stood out for presenting the best results.

Keywords: ironstone outcrops neotropical savana mining. *Paraburkholderia* biological nitrogen fixation *Bradyrhizobium*

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Quadrilátero Ferrífero e os impactos da mineração.....	12
2.2	Fixação Biológica de Nitrogênio.....	13
2.3	Diversidade de bactérias no solo.....	15
2.3.1	Bactérias do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	16
2.3.2	Bactérias do gênero <i>Paraburkholderia</i>	17
2.4	Feijão caupi.....	18
2.5	<i>Mimosa bimucronata</i>	18
	REFERÊNCIAS.....	20
	SEGUNDA PARTE.....	26
	ARTIGO 1 – New <i>Bradyrhizobium</i> species eficiente in fixing N ₂ in symbiosis with cowpea are found in áreas after Fe mining.....	26
1	INTRODUÇÃO	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A.....	59
	ANEXO B.....	62
	ANEXO C.....	65
	ANEXO D.....	68
	ARTIGO 2 – Eficiência simbiótica em <i>Mimosa bimucronata</i> e caracterização genética de estirpes de <i>Paraburkholderia</i> originárias de solos do Quadrilátero Ferrífero	71
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXO A.....	99
	ANEXO B.....	102
	ANEXO C.....	105
	ANEXO D.....	108

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais possui destaque no setor minerário principalmente pela extração de ferro. Através da remoção do solo e conseqüente remoção da cobertura vegetal, esta atividade pode provocar alterações profundas nos ecossistemas.

Depois de exploradas, as áreas impactadas devem ser restauradas. Uma das práticas iniciais mais comuns é a revegetação. Para que haja sucesso nos processos de sucessão ecológica nestes ambientes, são necessárias práticas que promovam uma melhoria das condições do solo, já que o processo de mineração promove alterações físicas e até químicas do solo, ocasionando perda da matéria orgânica e redução da fertilidade natural, o que acaba dificultando ou até mesmo inviabilizando a recuperação de forma natural destas áreas.

Os microrganismos são responsáveis por processos importantes, como a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, degradação de xenobióticos, atuam como promotores do crescimento vegetal melhorando a absorção de nutrientes pelas plantas, oferecem proteção contra patógenos e participam da fixação biológica de nitrogênio, processo em que bactérias fixam o nitrogênio atmosférico convertendo-o em formas assimiláveis pelas plantas.

A associação entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio possui vantagens ambientais, pois constitui uma fonte de N limpa e econômica, reduzindo os impactos provocados pelas perdas de N e diminuindo os custos de produção. Sendo assim, o aproveitamento deste processo em práticas de recuperação ambiental auxilia na otimização do manejo e recuperação de áreas degradadas. Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas, destacam-se as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Este gênero apresenta atualmente 84 espécies descritas, isoladas de variados hospedeiros e ambientes (AHNIA et al., 2018; AVONTUUR et al., 2022; BUNGER et al., 2018; CHANG et al., 2010; FOSSOU et al., 2020; GRONEMEYER et al., 2015; GRONEMEYER et al., 2017; LU et al., 2014; MATOS et al., 2017; YAO et al., 2002). Estas bactérias podem estabelecer simbiose com o feijão caupi (*Vigna unguiculata*), uma espécie capaz de se associar com diferentes espécies de bactérias e por isso muito utilizada em estudos de diversidade.

Alguns trabalhos descrevem espécies isoladas de nódulos de feijão caupi, como *B. kavanjense* (GRONEMEYER ET AL., 2015), *B. uaiense* (MICHEL et al., 2020), *B. vignae*

(GRONEMEYER et al., 2016), *B. brasilense* (COSTA et al., 2017), e *B. cenepequi* (KLEPA et al., 2022). Além disso, há trabalhos em que espécies de *Bradyrhizobium* isoladas de outras plantas hospedeiras como *B. acaciae*, *B. oropedii* e *B. altum* (AVONTUUR et al., 2022), *B. ripae* (BUNGER et al., 2018), *B. sacchari* (MATOS et al., 2017), *B. subterraneum* (GRONEMEYER et al., 2015), *B. yuanmingense* (YAO et al., 2002), *B. ivorensense* (FOSSOU et al., 2020), *B. lablabii* (CHANG et al., 2010), *B. namibiense* (GRONEMEYER et al., 2017) foram testadas em feijão caupi e observou-se a presença de nódulos eficazes.

O gênero de rizóbios *Paraburkholderia*, foi criado para incluir estirpes de *Burkholderia* não patogênicas, sendo a maioria delas isoladas de amostras ambientais como solo e água. Atualmente são descritas cerca de 127 espécies. Este grupo de microorganismos inclui bactérias capazes de fixar nitrogênio como *P. lycopersici*, isolada da rizoesfera de tomateiro (TAPIA et al., 2020), *P. podalyriae*, isolada de nódulos de *Podalya calytrata* (MAVIMA et al., 2021), *P. symbiotica* isolada de nódulos de *Mimosa cordistipula* (SHEU et al., 2012), *P. youngii*, *P. atlântica* e *P. franconis*, isoladas de nódulos de *Mimosa pudica* (MAVIMA et al., 2021; PAULITSCH et al., 2020).

Estas bactérias também podem estabelecer simbiose com espécies de *Mimosa*, um grupo de leguminosas arbóreas. Essa associação pode ser explicada com base em características do solo, como pH e níveis de nitrogênio e outros nutrientes, salinidade e a presença de metais pesados. Dentre as espécies de *Mimosa*, a espécie *Mimosa bimucronata* exerce papel ecológico importante em processos de restauração de áreas degradadas, sendo utilizada como cobertura vegetal e participando da ciclagem de nutrientes em processos como a fixação de N, melhorando as condições edáficas. Dentre as espécies de *Paraburkholderia* capazes de estabelecer simbiose e nodular *Mimosa bimucronata* estão *P. nodosa* e *P. phymatum* (CHEN et al., 2007; ELLIOTT et al., 2007).

As ferramentas moleculares têm sido muito utilizadas nos últimos anos. Através destas técnicas, é possível identificar estirpes eficientes em promover o crescimento vegetal, selecionando as mais eficientes. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivos avaliar estirpes bacterianas oriundas de solos do Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia* quanto à sua eficiência em promover o crescimento e nodular respectivamente *Vigna Unguiculata* e *Mimosa bimucronata*, verificar o posicionamento das estirpes em estudo em relação às espécies tipo já descritas, com base nas sequencias parciais do gene rRNA 16S e o sequenciamento dos genomas de estirpes representativas de grupos obtidos por sequencias parciais do gene rRNA 16S, além de identificar possíveis novas espécies dentre as estirpes analisadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Quadrilátero Ferrífero e os impactos da mineração

O Quadrilátero Ferrífero está localizado no estado de Minas Gerais. A principal atividade nesta região é a mineração, já que a geologia local implica numa variada gama de litotipos e derivados passíveis de exploração mineral. Em termos de relevância econômica, as rochas pertencentes ao supergrupo Itabira possuem destaque, principalmente os minérios de ferro, também conhecidos como Banded Iron Formation (BIF's) ou itabiritos. Além disso, outros litotipos com constituição ferruginosa estão presentes, como rochas ultrabásicas e dolomitos ferruginosos e possuem influência sobre os solos desta região (ROESER; ROESER, 2010; DE CARVALHO FILHO et al., 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de ferro, sendo grande parte do minério extraída do Quadrilátero Ferrífero e a maior uma parcela da sua produção exportada para a China (DIAS et al., 2013; CARMO; JACOBI, 2013). Para a abertura de lavras e depósitos de minério, é necessária a remoção do solo e da cobertura vegetal, o que impacta diretamente as áreas sob a influência destes empreendimentos, gerando modificações no ecossistema.

Dentro da área pertencente ao Quadrilátero Ferrífero, encontram-se fitofisionomias relevantes no contexto da biodiversidade do Brasil e que sofrem influência das atividades humanas locais, especialmente a mineração. Dentre estas, estão o Cerrado, composto por áreas florestais com matas ciliares e de galeria, áreas abertas de campo, áreas intermediárias como cerradão e a Mata Atlântica (AZEVEDO et al., 2012). Outro tipo de vegetação característica desta região é a vegetação rupestre, presente em locais onde predominam afloramentos rochosos, localmente conhecidas como Canga, contendo bancadas lateríticas formadas por oxihidróxidos de ferro. A vegetação destes locais é marcada pela presença de gramíneas, espécies arbustivas e orquídeas, caracterizando um ambiente singular e diretamente afetado pela mineração, devido ao fato de estarem relacionados a depósitos de minério de ferro de alta qualidade, deixando estes ambientes com características particulares na lista dos locais mais ameaçados e conseqüentemente menos estudados (JACOBI; CARMO, 2008).

Após a etapa de mineração, as áreas exploradas e impactadas devem ser recuperadas e a legislação exige que as empresas apresentem um plano para a recuperação destes locais (MEIRA et al., 2016). Para que a recuperação ambiental seja realizada de forma efetiva, são

necessários estudos que avaliem as características das fitofisionomias impactadas. Uma parte destes ambientes que muitas vezes é negligenciada é a microbiota edáfica, e pouca atenção é dada a estes organismos que desempenham funções essenciais para a manutenção dos ecossistemas.

Por terem um papel importante nos processos que ocorrem no ambiente, os microorganismos podem ser utilizados como indicadores de qualidade ambiental, já que condições de alteração de pH, teores de alumínio e matéria orgânica, dentre outros estão entre os fatores que mais influenciam a ocorrência de microrganismos no solo e muitas das vezes, os solos nos locais de mineração por exemplo, podem sofrer alterações quanto a estes fatores (JESUS et al., 2009; LAUBER et al., 2008).

Outros processos como a mineralização, decomposição de xenobióticos e a fixação biológica de nitrogênio pela microbiota edáfica podem beneficiar ambientes degradados, já que são mediados por diferentes grupos de microrganismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Como os microrganismos desempenham papel importante nos processos biológicos, conhecer e entender suas funções no ambiente faz com que a recuperação destas áreas seja realizada da melhor maneira possível.

De acordo com Siqueira et al. (1994), a recuperação de áreas degradadas é dependente da atividade microbiana, já que esta promove alterações nutricionais favoráveis ao estabelecimento das plantas, trazendo melhorias não só de fatores nutricionais, mas também de aspectos físicos do solo, como a estabilidade de agregados, promovida através da ação de fungos micorrízicos. Levando estes aspectos em consideração, o estabelecimento das plantas e a sustentabilidade do sistema em recuperação é favorecido.

Sendo assim, a elaboração de trabalhos que busquem conhecer e estudar a diversidade de microrganismos nestes ambientes e as funções que estes desempenham torna-se útil para a sua possível utilização em processos de reabilitação de áreas degradadas.

2.2 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento importante para os ecossistemas, fazendo parte da composição de aminoácidos, proteínas e outros compostos. Além disso, está envolvido em variadas reações químicas e biológicas das plantas, portanto é requerido em grande quantidade. Apesar disso, o N₂ atmosférico não é prontamente assimilável por grande parte dos seres vivos,

porém um grupo de microorganismos conhecido como diazotróficos é capaz de utilizá-lo.

A fixação do nitrogênio pode acontecer de 3 maneiras: por descargas elétricas - a chamada fixação atmosférica, por processos industriais que produzem os fertilizantes nitrogenados, através do processo Haber Bosch, utilizando elevadas pressão e temperatura e requer altos custos para sua produção, além disso os fertilizantes produzidos por este sistema podem ser perdidos por lixiviação e volatilização, caso o manejo não seja adequado (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Outra maneira em que ocorre a fixação do N_2 é a chamada fixação biológica de nitrogênio (FBN), mediada pelos diazotróficos. Neste processo, estes microorganismos convertem o N_2 atmosférico em formas assimiláveis por plantas e outros organismos. As bactérias em simbiose com espécies vegetais convertem o N_2 atmosférico em NH_3 através da enzima nitrogenase. A maior parte do N fixado em nosso planeta provem deste processo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; COSTA, 2013).

Entre as bactérias capazes de estabelecer simbiose com espécies vegetais, as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL), são encontradas em simbiose com plantas da família *Fabaceae* e esta simbiose caracteriza-se por uma relação mutualística, pois a planta absorve o nitrogênio assimilável e o simbionte utiliza os fotossintatos produzidos pela planta. São encontradas colonizando os tecidos internos e promovendo modificações fisiológicas e morfológicas, que dão origem aos nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Após a infecção da planta, a fixação do N ocorre no interior dos nódulos, presentes nas raízes. Quando os nódulos estão ativos, ou seja, o processo de FBN está acontecendo em seu interior, estes apresentam coloração avermelhada devido a presença da proteína leghemoglobina, responsável por transportar oxigênio até as BFNNL presentes no interior do nódulo e por manter a baixa concentração de oxigênio no meio, já que a nitrogenase é sensível à presença de O_2 .

Estes microorganismos possuem alta diversidade genética e morfológica. A simbiose pode apresentar alta especificidade entre planta hospedeira e simbionte ou incluir espécies promíscuas, capazes de estabelecer essa interação com variadas espécies. Além disso, a FBN pode ter influência de fatores nutricionais como a deficiência de potássio (GUALTER et al., 2008), fósforo (SILVA et al., 2010), micronutrientes (GUALTER et al., 2008; KUSDRA, 2003; LEITE et al., 2009), toxicidade por alumínio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e por fatores biológicos, relacionados com a interação entre planta e estirpe (BRITO et al., 2011) e a competição das estirpes com as comunidades nativas do solo.

Dentre os benefícios da utilização da FBN, estão as vantagens econômicas e ecológicas. Sua utilização promove a melhoria das condições edáficas, como aumento da matéria orgânica

e da fertilidade do solo e o seu manejo adequado no processo de recuperação de áreas degradadas facilita o estabelecimento das espécies durante as fases de sucessão vegetal. De acordo com Moreira e Siqueira (2006), o uso de inoculantes com estirpes fixadoras de nitrogênio pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* na cultura da soja, vem beneficiando economicamente o Brasil.

A utilização do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) possibilitou aos produtores de soja economizar US\$ 15,2 bilhões em fertilizantes químicos na safra 2019-2020 (TELLES et al., 2023). Além disso, o emprego de inoculantes reduz a utilização de adubos nitrogenados, proporcionando uma melhoria da qualidade ambiental, diminuindo os riscos de contaminação do ambiente por processos de volatilização, lixiviação e desnitrificação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SAWADA et al., 2003).

As BFNNL, são capazes de beneficiar o crescimento vegetal também de outras formas, através da produção de hormônios, solubilização de fosfatos inorgânicos e produção de exopolissacarídeos. Sendo assim, trabalhos que avaliam a capacidade destas bactérias em promover o crescimento vegetal e identificam estirpes de BFNNL, são importantes para uma melhor compreensão do seu papel no solo, bem como para a seleção de estirpes com potencial para utilização como inoculantes, substituindo assim a utilização da adubação nitrogenada.

2.3 Diversidade de bactérias nos solos

O solo é *hábitat* para uma série de microrganismos como fungos, protozoários e bactérias. Grande parte das bactérias encontradas no ambiente rizosférico são altamente dependentes de interações com plantas (PANIZZON et al., 2016), desempenhando papéis importantes na manutenção da qualidade do solo e produtividade das plantas. No entanto, apenas uma pequena parcela (<0,1%) da comunidade microbiana do solo tem sido acessível e o desenvolvimento de métodos eficazes para o estudo da diversidade, distribuição e comportamento de microrganismos no ambiente edáfico é condição básica para uma compreensão mais ampla dos processos envolvidos na qualidade do solo.

Além das bactérias simbióticas, pode haver também a presença de bactérias endofíticas, presentes no interior de nódulos de leguminosas, como as dos gêneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Enterobacter* e *Paenobacillus* que são encontrados com maior frequência (CASTRO et al., 2017).

Diversos fatores podem influenciar a diversidade e a estrutura das comunidades de bactérias do solo, dentre eles a cobertura vegetal e pH (ARAUJO et al., 2017; CASTRO et al.,

2017; SOARES et al., 2014;). Estudos que envolvam a diversidade de microrganismos do solo são importantes para a compreensão do papel destes no ecossistema, já que possuem potencial como fonte de recursos genéticos e biotecnológicos. A utilização de técnicas moleculares contribui para a identificação a nível de gênero ou espécies de bactérias e também para estudos de taxonomia (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Diante disso, estudos envolvendo a caracterização e identificação de BFNNL são importantes para a avaliação de sua diversidade e eficiência em fixar nitrogênio e para a seleção de estirpes com potencial para utilização como inoculantes de leguminosas. Os estudos para identificação da diversidade dessas bactérias podem ser realizados através do isolamento de nódulos das plantas em campo ou em experimentos de captura, onde as plantas são inoculadas com diluições de solo.

Em condições axênicas, os testes envolvem o cultivo de plantas-isca em laboratório capazes de estabelecer simbiose com uma ampla gama de rizóbios. Assim, é possível observar a especificidade da simbiose, que pode variar de acordo com a estirpe e a leguminosa testadas. Algumas estirpes são capazes de nodular variadas espécies de leguminosas, enquanto outras nodulam apenas gêneros específicos. Existem também leguminosas capazes de estabelecer simbiose com variadas espécies de BFNNL, como siratro (*Macroptilium atropurpureum*), o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e o feijão caupi (GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013; LIMA et al., 2009; MELLONI et al., 2006; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2011).

As técnicas moleculares utilizadas para a identificação de estirpes, como o sequenciamento do gene rRNA 16S, a análise de genes funcionais como os *housekeeping* (*atpD*, *recA*, *glnII*, *gyrB* e *rpoB*) e a identidade média de nucleotídeos de genes (ANI) são importantes para uma melhor compreensão da diversidade genética e a relação entre as estirpes.

2.3.1 Bactérias do gênero *Bradyrhizobium*

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* foram descritas por Jordan (1982). Este gênero é capaz de formar simbiose com leguminosas e fixar nitrogênio e atualmente são descritas 85 espécies (PARTE et al., 2020). Algumas destas espécies foram isoladas de nódulos de feijão caupi, como *B. kavanjense* encontrada em plantas cultivadas por agricultores na Namíbia (GRONEMEYER et al., 2015), *B. uaiense*, isolada de plantas de feijão caupi cultivadas em solo de mineração de bauxita em Minas Gerais (MICHEL et al., 2020), *B. vignae* isolada de nódulos radiculares de plantas cultivadas em campos de agricultores na Namíbia (GRONEMEYER et al., 2016), *B. brasilense*, isolada de solos tropicais do Brasil (COSTA et

al., 2017), e *B. cenepequi* isolada de nódulos radiculares de feijão caupi cultivado em solos da Austrália Ocidental (KLEPA et al., 2022).

Estirpes de *Bradyrhizobium* estão entre os principais simbiossiontes de leguminosas como a soja e o feijão caupi (CASTRO et al., 2017) e apresentam grande diversidade de espécies (GUIMARÃES et al., 2012; LEITE et al., 2017; MAQUIA et al., 2020; MOREIRA; SIQUEIRA 2006; NDUNGUA et al., 2018; PULE-MEULENBERG et al., 2010).

Algumas estirpes de *Bradyrhizobium* já são recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como inoculantes para o feijão caupi: UFLA 03-84, INPA 03-11B, BR3267 e BR3262 (BRASIL, 2011). A estirpe INPA 03-11B foi identificada como *Bradyrhizobium elkanii* (GUIMARÃES et al., 2015), a estirpe BR 3267 como *Bradyrhizobium yuanmingense* e a estirpe BR 3262 como *Bradyrhizobium pachyrhizi* (LEITE et al., 2017) e a estirpe UFLA 03-84 como *Bradyrhizobium viridifuturi* (COSTA et al., 2019). Por estarem presentes nos mais variados ambientes e serem capazes de se associar a plantas com importância principalmente para a agricultura, estudos que busquem identificar estirpes eficientes em promover o crescimento vegetal, reduzindo os custos de produção sem prejuízo ao ambiente são cada vez mais importantes.

2.3.2 Bactérias do gênero *Paraburkholderia*

As bactérias pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* podem ser encontradas nos mais variados ambientes, incluindo o solo, a água e em associações com plantas (incluindo nódulos de leguminosas e a rizosfera). Este gênero foi proposto em 2014 por Sawana e colaboradores, com base em estudos de taxonomia, para reclassificar algumas espécies antes incluídas dentro do gênero *Burkholderia*. Isto se deve ao fato de que apesar de compartilharem características semelhantes, as *Paraburkholderias* têm como principal *hábitat* os ecossistemas, diferente das *Burkholderias* que incluem cepas patogênicas, responsáveis por causar doenças respiratórias e infecções graves em seres humanos (SAWANA et al., 2014; TAPIA-GARCIA et al., 2020; VIO et al., 2020).

Atualmente são descritas cerca de 114 espécies de *Paraburkholderia* (PARTE et al., 2020). Algumas estirpes deste gênero podem favorecer o crescimento vegetal através da liberação de compostos rizosféricos. São responsáveis por fornecer fósforo às plantas, pela produção de sideróforos e exopolissacarídeos, produção de hormônios de crescimento, antibióticos e fixação biológica de nitrogênio (CHEN et al., 2005; FERREIRA et al., 2010; GLICK, 2012; SOUZA et al., 2020).

Dentre as leguminosas capazes de estabelecer relação simbiótica com estas bactérias, o gênero *Mimosa* se destaca por possuir afinidade pela nodulação por β -proteobactérias (CHEN et al., 2003). Os resultados obtidos por Bontemps et al. (2010), mostram que nos biomas Cerrado e Caatinga, a nodulação de *Mimosa spp*, está associada a bactérias do gênero *Paraburkholderia*. Alguns trabalhos sugerem que as condições edafoclimáticas influenciam de modo significativo a ocorrência deste gênero, já que predominam em solos mais ácidos (BONTEMPS et al., 2010; CASTRO et al., 2017; DIAS et al. 2021; DOS REIS JR et al., 2010).

A identificação de estirpes de *Paraburkholderia* capazes de se adaptar a diferentes condições do solo e que sejam capazes de promover o crescimento vegetal torna-se cada vez mais importante para a seleção de estirpes com potencial para utilização como inoculantes.

2.4 Feijão caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa cultivada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Suas plantas são utilizadas para consumo humano e animal, devido ao elevado teor nutricional, sendo aproveitadas sementes, vagens e folhas (KEBEDE; BEKEKO, 2020). Uma importante característica desta planta é a sua rusticidade, o que a torna capaz de tolerar altas temperaturas e déficits hídricos significativos. No Brasil, os locais com clima mais árido correspondem aos maiores produtores deste grão, destacando-se a região Nordeste.

A região centro-oeste, representada pelo estado de Mato Grosso e a região sudeste, especialmente o norte do estado de Minas Gerais (CONAB, 2021) também são produtores deste grão. Devido à sua capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas de diferentes gêneros, o feijão caupi é considerado uma planta promíscua e tem sido utilizado como planta isca em vários estudos que avaliaram a diversidade de rizóbios (CASTRO et al., 2017; COSTA et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2012;).

2.5 *Mimosa bimucronata*

As plantas de *Mimosa bimucronata* são árvores ou arbustos arborescentes, semicaducifólias a caducifólias, aculeadas, que podem chegar a atingir 10 metros de altura. No Brasil a sua distribuição geográfica inclui os estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Ceará. As plantas desta espécie têm preferência por locais úmidos e possuem uma

importante função ecológica, por se tratar de uma espécie pioneira na sucessão florestal. Esta planta pode ser utilizada em áreas de recuperação ambiental e possui grande importância em processos de reflorestamento, podendo ser utilizada em áreas de proteção permanente, locais com risco de erosão e em manejos florestais, devido à sua capacidade rápida de crescimento e rusticidade (CARVALHO, 2003; CARVALHO, 2004).

O gênero *Mimosa*, se destaca por incluir plantas capazes de formar simbiose com por β -proteobactérias (CHEN et al., 2003). Devido à esta característica, alguns trabalhos têm se concentrado em estudar a relação entre o gênero *Mimosa* e estirpes dos gêneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Trinickia* spp. (BONTEMPS et al., 2010; CHEN et al., 2005a, b, 2006, 2007, 2008; MISHRA et al., 2012).

O trabalho de Bontemps et al. (2010), mostrou que a nodulação de *Mimosa* spp, em ambientes de Cerrado e Caatinga está associada a bactérias do gênero *Paraburkholderia*. Já o trabalho de Soares Neto et al. (2022) observou que as espécies *Mimosa somnians* e *Mimosa clausenii*, são preferencialmente noduladas por estirpes de *Paraburkholderia* spp. Alguns trabalhos sugerem que as condições edafoclimáticas influenciam de modo significativo a ocorrência deste gênero, já que predominam em solos mais ácidos (BONTEMPS et al., 2010; CASTRO et al., 2017; DIAS et al. 2021; REIS JR et al., 2010).

Dentre as espécies de *Paraburkholderia* descritas, *P. nodosa* foi isolada de nódulos efetivos de *Mimosa bimucronata*, (CHEN et al., 2007). O trabalho de Araújo et al. (2017), avaliou a capacidade simbiótica de estirpes de *Paraburkholderia* inoculadas em *Mimosa bimucronata* e *M. foliolosa* e seus resultados mostraram que as estirpes UFLA 01–739, 01–748 e 04–405 são potenciais inoculantes para *M. bimucronata*.

Tendo em vista que estirpes de *Paraburkholderia* nodulam naturalmente plantas de *Mimosa*, estudos que busquem a identificação e seleção de estirpes com potencial para inoculação em plantas de *Mimosa bimucronata* tornam-se importantes, pois estas plantas possuem alta taxa de crescimento e boa adaptação em locais com solos de fertilidade baixa. (NEGREIROS et al. 2009; SILVA et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- AHNIA, H. *et al.* *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. **Systematic and applied microbiology**, v. 41, n. 4, p. 333-339, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.03.004>
- ARAÚJO, K. S. *et al.* *Burkholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macropitium atropurpureum*. **Revista Ciência Agronômica**. 2017;48(1):41-48. doi: 10.5935/1806-6690.20170005
- AVONTUUR, J. R. *et al.* *Bradyrhizobium altum* sp. nov., *Bradyrhizobium oropedii* sp. nov. and *Bradyrhizobium acaciae* sp. nov. from South Africa show locally restricted and pantropical *nodA* phylogeographic patterns. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 167, p. 107338, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107338>
- AZEVEDO, U. R. *et al.* Quadrilátero Ferrífero (MG). SILVA, C. R. (Ed.). **Geoparques do Brasil: propostas**. Rio de Janeiro, v. 1, 2012, 748 p. Disponível em: http://dspace.cprm.gov.br/bitstream/doc/17160/1/GeoparquesDoBrasil_cap1.pdf
- BONTEMPS, C. *et al.* *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n° 13 de 24 de março de 2011**. Retrieved from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view> . Acessado em 27 de maio de 2022.
- BRITO, M. M. P. *et al.* Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 206-215, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052011000100027>
- BÜNGER, W. *et al.* *Bradyrhizobium ripae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of wild legumes in Namibia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3688-3695, 2018. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002955>
- MICHEL, D. C. *et al.* *Bradyrhizobium uaiense* sp. nov., a new highly efficient cowpea symbiont. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1135-1141, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01827-w>
- CARMO, F. F.; JACOBI, C. M. Canga vegetation in the Iron Quadrangle, Minas Gerais: characterization and phytogeographical context. **Rodriguésia**, v. 64, p. 527-541, 2013. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602013000300005>
- CARVALHO, P. Espécies arbóreas brasileiras. **Embrapa Florestas**, 1 ed. v. 1. Colombo, 2003. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/305634>. Acesso em: 20 de jul. de 2022.
- CARVALHO, P. Maricá: *Mimosa bimucronata*. **Embrapa Colombo**, circular técnica 94: 1-10, 2004. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/313255>. Acesso em: 10 de mai. de 2022.
- CASTRO, J. L. *et al.* Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20160525>

- CHANG, Y. L. *et al.* *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea* grown in Southern China. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Epub. Nov, v. 26, p. 0.027110-0, 2010. doi:10.1099/ij.s.0.027110-0
- CHEN, W. M. *et al.* Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in Nature. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, 2003. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7266-7272.2003>
- CHEN, W. M. *et al.* Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005a. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7461-7471.2005>
- CHEN, W. M. *et al.* β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytol** 168, 661–675. (2005b). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01533.x>
- CHEN, W. M. *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.
- CHEN, W. M. *et al.* *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **Int J Syst Evol Microbiol** 58:2174–2179. (2008). <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65816-0>
- COSTA, E. M. *et al.* *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 1211-1221, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1390-1>
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos Acomp. safra bras. grãos v.8**– Safra 2020/21, n.5 - Quinto levantamento, Brasília, p. 1-94. ISSN 2318-6852. fevereiro 2021.
- COSTA, E. M. *et al.* Classification of the inoculant strain of cowpea UFLA 03-84 and of other strains from soils of the Amazon region as *Bradyrhizobium viridifuturi* (symbiovar tropici). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 335-345, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00045-x>
- COSTA, E. M. *et al.* Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>
- DE CARVALHO, F. *et al.* Relações solo paisagem no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 903-916, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000800017>
- DOS REIS JR, F. B. *et al.* Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>
- ELLIOTT, G. N. *et al.* *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 168-180, 2007. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01894.x
- FERREIRA, A. S. *et al.* Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to

stress conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 2, p. 441-450, 2010. <https://doi.org/10.1128/AEM.01828-09>

FOSSOU, R. K. *et al.* *Bradyrhizobium ivorense* sp. nov. as a potential local bioinoculant for *Cajanus cajan* cultures in Côte d'Ivoire. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1421, 2020. doi.org/10.1099/ijsem.0.003931

GLICK, B. R. *et al.* Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

GRÖNEMEYER, J. L. *et al.* *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. Pt_12, p. 4886-4894, 2015. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000666>

GRÖNEMEYER, J. L. *et al.* *Bradyrhizobium namibiense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of *Lablab purpureus*, hyacinth bean, in Namibia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 4884-4891, 2017.

GUALTER, R. M. R. *et al.* Inoculação e adubação mineral em feijão-caupi: efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.4, p. 469-474, 2008. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2903887>

GUIMARÃES, A. A. *et al.* Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, Sept. 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>

GUIMARÃES, A. A. *et al.* High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 433-441, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>

JACOBI, C. M.; DO CARMO, F. F. The contribution of ironstone outcrops to plant diversity in the Iron Quadrangle, a threatened Brazilian landscape. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 37, n. 4, p. 324-326, 2008.

JARAMILLO, P. M. D. *et al.* Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 6, p. 397-404, nov. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000600004>

JESUS, E. C. *et al.* Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME journal**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.47>

Jordan, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanam 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **Int J Syst Bact.** 32:136-9, 1982.

KEBEDE, E.; BEKEKO, Z. Expounding the production and importance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Ethiopia. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1769805, 2020. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1769805>

KLEPA, M. S. *et al.* *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and

definition of three novel symbiovars. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 005446, 2022.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005446>

KUSDRA, J. F. Nodulação do feijoeiro e fixação biológica do nitrogênio em resposta à microbiolização das sementes e à aplicação de micronutrientes. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.4, p.81-96, 2003. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=99518008026>

LAUBER, C.L. *et al.* The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biol Biochem.** 40:2407-15, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>

LEITE, L. F. C. *et al.* Nodulação e produtividade de grãos do feijão-caupi em resposta ao molibdênio. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.40, n.4, p.492-497, 2009.

LEITE, J. *et al.* Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2064, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02064>

LIMA, A. S. *et al.* Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant Soil**, The Hague, v. 319, n. 1, p. 127–145, June 2009.

<https://doi.org/10.1007/s11104-008-9855-2>

LU, J. K. *et al.* *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt 6, p. 1900, 2014. doi: 10.1099/ijms.0.056564-0

MAQUIA, I. S. *et al.* Mining the microbiome of key species from African savannawoodlands: Potential for soil health improvement and plant growth promotion. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1291, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091291>

DE MATOS, G. F. *et al.* *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. **Archives of microbiology**, v. 199, p. 1251-1258, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1398-6>

MAVIMA, L. *et al.* Delineation of *Paraburkholderia tuberum* sensu stricto and description of *Paraburkholderia podalyriae* sp. nov. nodulating the South African legume *Podalyria calyptata*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 126316, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126316>

MEIRA, R. M. S. A. *et al.* Brazil's mining code under attack: giant mining companies impose unprecedented risk to biodiversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 25, n. 2, p. 407–409, fev, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1050-9>

MELLONI, R. *et al.* Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, mar./abr, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000200005>

MISHRA, R. P. N. *et al.* Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS microbiology ecology**, v. 79, n. 2, p. 487-503, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01235.x>

- MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CAB International Publishing, 2006, p. 237-270.
- NDUNGU, S. M. *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 261, p. 161-171, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.014>
- NEGREIROS, D. *et al.* Seedling growth and biomass allocation of endemic and threatened shrubs of rupestrian fields. **Acta oecologica**, v. 35, n. 2, p. 301-310, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2008.11.006>
- ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Change in land use alters the diversity and composition of *Bradyrhizobium* communities and led to the introduction of *Rhizobium etli* into the Tropical Rain Forest of Los Tuxtlas (Mexico). **Microbial Ecology**, New York, v. 63, n. 4, p. 822–834, May 2011. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9974-9>
- PANIZZON, J. P. *et al.* Bacteria-soil-plant interaction: this relationship to generate can inputs and new products for the food industry. **Rice Res.** 4:1-6, 2016. <https://doi.org/10.4172/2375-4338.1000165>
- PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607-5612, 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- PAULITSCH, F. *et al.* *Paraburkholderia atlantica* sp. nov. and *Paraburkholderia franconis* sp. nov., two new nitrogen-fixing nodulating species isolated from Atlantic forest soils in Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1369-1380, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01843-w>
- PULE-MEULENBERG, F. *et al.* Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-89>
- ROESER, H. M. P.; ROESER, P. A. O Quadrilátero Ferrífero – MG, Brasil: aspectos sobre sua história, seus recursos minerais e problemas ambientais relacionados. **Geonomos**, v. 18, p.34-37, 2010.
- SAWADA, H. *et al.* Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 155-179, 2003. <https://doi.org/10.2323/jgam.49.155>
- SHEU, S. Y. *et al.* *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **Int J Syst Evol Microbiol** 63:435–441, 2013. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.039859-0>
- SHEU, S. Y. *et al.* *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **Int J Syst Evol Microbiol.** 62:2272–2278, 2012. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.037408-0>
- SILVA, L. A. *et al.* Reproduction biology of *Mimosa bimucronata*: a ruderal species. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1011-1021, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582011000500007>

SIQUEIRA, J.O. *et al.* Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão**. Centro Nacional de Pesquisa de Soja: EMBRAPA, 1994; 145 p.

SOARES NETO, C. B. *et al.* *Paraburkholderia atlantica* is the main rhizobial symbiont of *Mimosa* spp. in ultramafic soils in the Brazilian Cerrado biome. **Plant and Soil**, v. 479, n. 1-2, p. 465-479, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05536-9>

SOUZA, M. G. *et al.* Estirpes de *Paraburkholderia* oriundas de Campos Rupestres promovem o crescimento de *Mimosa foliolosa*. **Revista Árvore**, v. 44, 2020. <https://doi.org/10.1590/1806-908820200000012>

SPRENT, J. I. *et al.* Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017. <https://doi.org/10.1111/nph.14474>

TAPIA-GARCÍA, E. Y. *et al.* *Paraburkholderia lycopersici* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizoplane of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Saladette in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 126133, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126133>

TELLES, T. S. *et al.* Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, p. 103158, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103158>

VIO, S. A. *et al.* *Paraburkholderia*. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, 271–311. 2020. doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00015-0

YAO, Z. Y. *et al.* Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2219-2230, 2002. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2219>

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

Artigo 1 - New *Bradyrhizobium* species efficient in fixing N₂ in symbiosis with cowpea are found in areas after Fe mining

Jordana Luísa de Castro¹, Daniele Cabral Michel¹, Bárbara Luyse Marques Duarte¹, Fatima Maria de Sousa Moreira^{1*}

¹Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Campus UFLA, 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail: fmoreira@ufla.br (F.M. de Souza Moreira).

Abstract: In this study, 23 strains of N₂-fixing bacteria belonging to the *Bradyrhizobium* genus, coming from different phytophysiognomies of the *Quadrilátero Ferrífero* region of Minas Gerais, were evaluated regarding their efficiency in promoting cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] growth and nodulation under axenic conditions. The efficiency of biological nitrogen fixation was evaluated through determination of chlorophyll content in leaves using SPAD and shoot dry matter weight. Of the 21 strains that nodulated, UFLA 03-660, UFLA 03-502, UFLA 03-584, UFLA 03-683, UFLA 03-661, UFLA 03-703, UFLA 03-554, UFLA 03-689, UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-637, UFLA 03-704, UFLA 03-684, UFLA 03-663, UFLA 03-680, UFLA 03-500, and UFLA 03-671 had the highest values, which indicated their greater efficiency. From the 16S gene sequences of these strains, a phylogenetic tree was constructed that made it possible to observe the position of the strains in relation to the 71 species already described for this genus. The genome of the following 4 strains was also sequenced: UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-502, and UFLA 03-584. Application of Average Nucleotide Identity showed that these strains are potentially new species.

Keywords: Biological N₂ fixation *Bradyrhizobium*. Mining. *Vigna unguiculata*.

1 Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a legume mainly grown in tropical and semi-tropical regions of the world. The plants are used for human and animal consumption due to high nutritional content, making use of seeds, pods, and leaves (KEBEDE; BEKEKO, 2020).

An important characteristic of this plant is its resistance; it can be able to tolerate high temperatures and significant water deficits. In Brazil, locations with a more arid climate correspond to the largest producers of this grain, most prominently the Northeast region. The Central-West region, represented by the state of Mato Grosso, and the Southeast region, especially the north of the state of Minas Gerais (CONAB, 2021), are also producers of this grain.

Due to its ability to establish symbiosis with nitrogen-fixing bacteria that nodulate legumes of different genera, cowpea is considered a promiscuous plant and has been used as a trap plant in various studies that have evaluated rhizobial diversity (CASTRO et al., 2017; COSTA et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2012). The *Bradyrhizobium* genus stands out as one of the most frequent among the isolates of cowpea nodules and for being able to nodulate a wide range of leguminous species beyond cowpea (SPRENT et al., 2017).

Around 84 species of this genus have been described up to now. Some of these species were isolated from cowpea nodules, such as *B. kavanjense* found in plants cultivated by farmers in Namibia (GRONEMEYER et al., 2015), *B. uaiense*, isolated from cowpea plants cultivated in bauxite mining soil in Minas Gerais (MICHEL et al., 2020), *B. vignae* isolated from root nodules of plants in farmers' fields in Namibia (GRONEMEYER et al., 2016), *B. brasilense*, isolated from tropical soils in Brazil (COSTA et al., 2017) and *B. cenepequi* isolated from root nodules of cowpea grown in Western Australian soils (KLEPA et al., 2022).

Castro et al. (2017) used cowpea as a trap plant for capturing and testing the efficiency of communities of nitrogen-fixing bacteria present in soils of different phytophysionomies of the *Quadrilátero Ferrífero* (Iron Quadrangle) region of Minas Gerais. The 16S rRNA gene was sequenced through isolation of the bacteria present in the nodules of cowpea, and this allowed identification of nodulating bacteria among the isolates belonging to the *Burkholderia*, *Rhizobium*, and *Bradyrhizobium* genera, as well as other bacterial genera considered endophytic. The results showed that the communities were efficient in promoting plant growth and, in addition, partial sequencing of the 16S rRNA gene of strains isolated from these communities identified potential new species of bacteria, and among them, some belonging to the *Bradyrhizobium* genus.

Strains isolated from these communities and identified as belonging to the *Bradyrhizobium* genus were studied in this research in relation to their genetic characteristics and symbiotic efficiency relationship with cowpea.

2 Materials and Methods

Origin of the strains

The 23 strains used in this experiment come from soil samples from areas belonging to Mineradora Vale S/A, which were collected in the municipal regions of Nova Lima, MG, at the Centro Tecnológico de Ferrosos – Miguelão, and in Brumadinho, MG, at the Córrego do Feijão Mine, in four different phytophysionomies, identified as Cerrado, Atlantic Forest, Rupestrian Grassland (Canga), and an area replanted with grasses. To capture these strains, an experiment was set up in the Soil Biology, Microbiology, and Biological Processes sector where dilutions of the soil samples of each phytophysionomy were made, and then they were inoculated on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seeds for growing under axenic conditions. Subsequently, the efficiency of the bacterial communities of these phytophysionomies in promoting the growth of cowpea was evaluated and the strains present in the nodules of these plants were isolated (Castro et al., 2017).

Efficiency of the *Bradyrhizobium* strains in nodulating and promoting plant growth in cowpea

To evaluate the efficiency of each strain of *Bradyrhizobium* sp. in establishing symbiosis and promoting plant growth in cowpea, an experiment was conducted from April to May 2019 in the greenhouse of the Soil Microbiology sector of the Department of Soil Science (Departamento de Ciência do Solo – DCS) of the Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

The strains of *Bradyrhizobium* sp. were grown in solid 79 culture medium (FRED; WAKSMAN, 1928), transferred to liquid 79 culture medium, and incubated on a platform shaker, according to the time of appearance of isolated colonies (from 6 to 10 days), at 150 rpm at 28°C to obtain inoculum for inoculation on the cowpea seedlings grown under axenic conditions. For axenic growing of cowpea, dark-colored recycled “long neck” bottles were used, covered with aluminum foil on the outside, containing Hoagland solution (HOAGLAND;

ARNON, 1950). Before sowing, the seeds were surface disinfected using ethyl alcohol at 92.8% (30 seconds), sodium hypochlorite at 2% (2 minutes), and then washed successively in sterile distilled water.

The 23 strains used in the experiment come from 3 different phytophysiognomies. The strains UFLA 03-554, UFLA 03-545, UFLA 03-671, UFLA 03-584, UFLA 03-660, UFLA 03-649, UFLA 03-661, UFLA 03-662, UFLA 03-663, UFLA 03-665, and UFLA 03-672 were obtained from soil of an area in rehabilitation replanted with grass; the strains UFLA 03-703, UFLA 03-704, UFLA 03-683, UFLA 03-689, UFLA 03-500, UFLA 03-680, UFLA 03-684, UFLA 03-502, and UFLA 03-678 were obtained from Cerrado soil; and UFLA 03-637, UFLA 03-626, and UFLA 03-629 come from Atlantic Forest soil.

The experiment was conducted with a completely randomized design. Each one of the strains represented one treatment, and all the treatments were conducted in triplicate and inoculated in bottles with Hoagland solution with low N concentration (5.25 mg N L^{-1}). Control treatments without inoculation were added, one with low N concentration (5.25 mg N L^{-1}) and another with high N concentration (52.5 mg N L^{-1}). A positive control was also added, with the reference strain UFLA 03-84, approved by the Brazilian Ministry of Agriculture (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) as a cowpea inoculant (BRASIL, 2011), also with low nitrogen (N) concentration.

The composition of the solution in the inoculated treatments and in the control with low N concentration in mL of stock solutions per 4 L of water was as follows: 0.4 of 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (236.16 g L^{-1}); 0.1 of 1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (115.03 g L^{-1}); 0.6 of 1 M KNO_3 (101.11 g L^{-1}); 2.0 of 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (246.9 g L^{-1}); 3.0 of 0.5 M K_2SO_4 (87.13 g L^{-1}); 10 of 0.05 M $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (12.6 g L^{-1}); 200 of 0.01 M $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.72 g L^{-1}); 1 of 0.06 M FeCl_3 (10 g L^{-1}); and 1 of micronutrients (H_3BO_3 , 2.86 mg L^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.03 mg L^{-1} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg L^{-1} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mg L^{-1} ; and $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.09 mg L^{-1}).

The composition of the solution in the control treatment without inoculation and with high concentration of mineral N (52.5 mg L^{-1}) of stock solutions in mL per 4 L of water was as follows: 4.0 of 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (236.16 g L^{-1}); 1 of 1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (115.03 g L^{-1}); 6 of 0.5 M K_2SO_4 (87.13 g L^{-1}); 2.0 of 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (246.9 g L^{-1}); 1 of 0.06 M FeCl_3 (10 g L^{-1}); and 1 of micronutrients (H_3BO_3 , 2.86 mg L^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.03 mg L^{-1} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg L^{-1} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mg L^{-1} ; and $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.09 mg L^{-1}).

Two strips of filter paper of 2 cm width and length equal to the height of the bottle were placed in each bottle containing nutrient solution to serve as support for the roots, as well as to promote contact of the nutrient solution with the plant. After that, all the bottles were autoclaved

for 60 minutes at a pressure of 1.5 kg cm² at 121°C. The experiment was conducted for a period of 45 days, and 2 days before the collection date, the symbiotic efficiency of the strains tested was evaluated through the Soil Plant Analysis Development (SPAD) index, an indirect measurement of the chlorophyll content in the plants. Measurements were made in the leaves of the middle and upper third of the plants, according to instructions from the manufacturer of the device.

At 45 days, the plants were collected, and the following parameters were determined: number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), root dry matter (RDM), and shoot dry matter (SDM). The semi-micro Kjeldahl methodology was used to evaluate the N foliar contents. The leaves were grinded and 0,1g of each sample was used in the procedure.

Analysis of variance was performed on the data from the trial using the statistical analysis program SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011). The NN and NDM data were transformed to the square root of (x+1). The effects of the treatments were compared by the Scott-Knott test at 5% probability (SCOTT; KNOTT, 1974). Violations of the ANOVA presuppositions were detected using the gvlma package v1.0.0.3; (PENA; SLATE, 2019). Analyses were performed in the R 4.2.0 environment (R CORE TEAM, 2022) and on the R Studio platform (RSTUDIO TEAM, 2022). The correlation (r) was verified between the shoot dry matter and the N content in the leaves and between the N content in the leaves and the chlorophyll content in the leaves.

Partial sequencing of the 16S rRNA gene

The 16S rRNA sequences obtained by Castro et al. (2017) were once more blasted in December 2019 for confirmation of identification at the genus level and used for construction of the phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene.

For construction of the tree, the 16S rRNA gene sequences of the type species of *Bradyrhizobium* were obtained in the Genbank (NCBI) in November 2021. Two phylogenetic trees were built for 16 S gene, one containing all the type strains already described and all the strains under study and another with all the type strains and the strains that had their genomic DNA sequenced. In addition, two phylogenetic trees were built, one based on concatenated sequences of *recA*, *gyrB*, *rpoB* genes, from the 4 strains under study that had genomic DNA sequenced: UFLA 03-502, UFLA 03-584, UFLA 03-662 and UFLA 03 -672 and the sequences of the type strains, except the strains *B. ganzhouense*, *B. americanum*. *B. centrosemae*. The second phylogenetic tree was based on concatenated sequences of the *recA*, *genII* and *atpD*

genes for the 4 strains under study that had genomic DNA sequenced: UFLA 03-502, UFLA 03-584, UFLA 03-662 and UFLA 03-672 and the sequences of the type strains

The sequences were aligned and edited with the MEGA7 software package (KUMAR et al. 2016). The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor Joining (NJ) statistical method with bootstrap based on 1000 replications. The Tamura 3-parameter model was used for the distance model for the tree (TAMURA, 1992).

Genome sequencing

The genome was sequenced in 4 strains: UFLA 03-502, isolated from the soil of the Cerrado area, and the strains UFLA 03-662, UFLA 03-672, and UFLA 03-584 obtained from soil from the area in rehabilitation replanted with grass. The UFLA 03-662, UFLA 03-672, and UFLA 03-584 strains were selected based on the phylogenetic tree of the 16S rRNA gene, which indicated that they were possible new species. The UFLA 03-502 strain was selected for having stood out in the efficiency experiment, just as the previously cited strains did. The bacteria selected were grown in liquid 79 medium for a period of 6 to 10 days. After that period, a 1 mL aliquot was removed from the culture medium of each strain, and the aliquots were transferred to microtubes. Then, DNA was extracted according to the DNA extraction protocol of the Wizard® Genomic DNA Purification kit. After genome sequencing, the results were analyzed on the Kbase platform (<https://www.kbase.us/>).

The genome was assembled using the SPADes 3.13.0 (BANKEVICH et al. 2012), and the quality and integrity of the genomes were checked with CheckM 1.0.18 (PARKS et al. 2015).

Average nucleotide identity (ANI)

The average nucleotide identity (ANI) was determined for comparison of the known and potentially new species of the same genus (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2016). To obtain the ANI, the Enveomics platform was used (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix/>) through the ANI/AAI Matrix tool, where the calculator of the matrix estimates the genetic relationship between the strains tested and the type species.

3 Results and Discussion

Efficiency of *Bradyrhizobium* strains in nodulating cowpea

The cowpea plants in the controls without inoculation with low and high N concentration did not exhibit nodulation, indicating that there was no contamination. The positive control inoculated with the strain UFLA 03-84 exhibited nodulation, and the cowpea grew in a satisfactory manner, indicating that the experimental conditions were favorable to establishing and proceeding with symbiosis. There was statistical difference among the treatments in relation to number of nodules (NN) (Table 1).

Table 1 - Number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), root dry matter (RDM), and shoot dry matter (SDM), index SPAD and N content of cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* strains (continue).

Treatment	NN	NDM	RDM	SDM	SPAD index	N content
Strain inoculated	mg per plant		---g per plant---		g/Kg ⁻¹	
UFLA 03-545*	0 c**	0 d	0.13 c	0.50 c	15.83 b	14,52 c
UFLA 03-629	62.00 b	34.00 b	0.16 c	0.47 c	14.33 b	11,67 c
UFLA 03-626	56.00 b	42.00 b	0.18 c	0.52 c	15.06 b	13,66 c
UFLA 03-660	45.33 b	60.00 a	0.17 c	0.50 c	51.13 a	49,47 a
UFLA 03-665	152.00a	54.00 b	0.19 c	0.53 c	19.06 b	8,41 c
UFLA 03-502	56.66 b	56.00 a	0.19 c	0.91 b	53.23 a	55,58 a
UFLA 03-584	60.00 b	73.00 a	0.19 c	0.57 c	38.0 a	36,94 a
UFLA 03-678	0 c	0 d	0.19 c	0.49 c	13.03 b	14,14 c
UFLA 03-683	42.66 b	70.00 a	0.19 c	0.77 c	48.26 a	48,65 a
UFLA 03-661	49.33 b	84.00 a	0.20 c	0.68 c	51.20 a	50,71 a
UFLA 03-703	69.00 b	73.00 a	0.21 b	0.62 c	48.63 a	46,62 a
UFLA 03-554	45.00 b	59.00 a	0.22 b	0.73 c	53.90 a	42,40 a

UFLA 03-689	56.66 b	70.00 a	0.21 b	0.71 c	45.10 a	50,26 a
UFLA 03-662	29.33 b	70.00 a	0.22 b	0.71 c	58.73 a	50,12 a
UFLA 03-672	78.00 b	74.00 a	0.22 b	0.61 c	46.66 a	31,76 b
UFLA 03-637	220.00a	58.00 a	0.22 b	0.67 c	53.73 a	31,48 b
UFLA 03-704	53.00 b	70.00 a	0.23 b	0.75 c	46.46 a	52,73 a
UFLA 03-684	43.00 b	79.00 a	0.24 b	0.73 c	51.00 a	49,47 a
UFLA 03-663	66.33 b	81.00 a	0.25 b	0.90 b	53.20 a	41,71 a
UFLA 03-680	37.33 b	63.00 a	0.25 b	0.74 c	53.80 a	51,53 a
UFLA 03-649	28.66 b	20.00 c	0.25 b	0.57 c	13.80 b	19,05 c
UFLA 03-500	61.33 b	65.00 a	0.25 b	0.64 c	49.63 a	50,74 a
UFLA 03-671	56.33 b	79.00 a	0.26 b	0.76 c	56.66 a	26,06 b
UFLA 03-84	118 a	33.00 b	0.13 c	0.54 c	40.06 a	0
Uninoculated						
Hig N content	0 c	0 d	0.36 a	1.31 a	44.90 a	45 a
Low N content	0 c	0 d	0.16 c	0.50 c	12.70 b	15,27 c
CV%	31.84	16.74	19.47	26.31	17.90	26,70

(Conclusion) Plants in the treatments inoculated with the different strains were grown in a solution with low concentration of mineral N. **Mean values followed by the same letter in the columns do not differ statistically by the Scott-Knott test at 5% probability.

Source: Author (2023)

The largest numbers of nodules were found in the plants inoculated with the strains UFLA 03-665, UFLA 03-637, and UFLA3-84. Plants inoculated with the strains UFLA 03-629, UFLA 03-626, UFLA 03-660, UFLA 03-502, UFLA 03-584, UFLA 03-683, UFLA 03-661, UFLA 03-703, UFLA 03-554, UFLA 03-689, UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-704, UFLA 03-684, UFLA 03-663, UFLA 03-680, UFLA 03-649, UFLA 03-500, and UFLA 03-671 formed nodules, but did not differ statistically from each other. The treatments inoculated with the strains UFLA 03-545 and UFLA 03-678 did not form nodules.

In relation to nodule dry matter (NDM), a statistical difference was found among the treatments. The plant inoculated with the strain UFLA 03-649 had the lowest nodule value. The plants inoculated with the strains UFLA 03-626, UFLA 03-665, UFLA 03-629, and UFLA 03-84 exhibited intermediate values. The largest nodule matter was observed in the treatments of inoculation with the strains UFLA 03-660, UFLA 03-502, UFLA 03-584, UFLA 03-683, UFLA 03-661, UFLA 03-703, UFLA 03-554, UFLA 03-689, UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-637, UFLA 03-704, UFLA 03-684, UFLA 03-663, UFLA 03-680, UFLA 03-500, and UFLA 03-671.

Statistical difference among the treatments was also found in relation to root dry matter (RDM) (Table 1). The highest RDM value was found in the control with high nitrogen concentration. The strains UFLA 03-554, UFLA 03-671, UFLA 03-649, UFLA 03-662, UFLA 03-663, UFLA 03-703, UFLA 03-704, UFLA 03-689, UFLA 03-500, UFLA 03-680, UFLA 03-672, UFLA 03-684, and UFLA 03-637 exhibited intermediate values. The strains UFLA 03-545, UFLA 03-584, UFLA 03-660, UFLA 03-661, UFLA 03-665, UFLA 03-683, UFLA 03-502, UFLA 03-678, UFLA 03-626, UFLA 03-629, and UFLA 03-84 exhibited the lowest values.

A statistical difference was found among the treatments in shoot dry matter (SDM). The treatment with high nitrogen concentration had the highest value for this variable. The treatments of inoculation with the strains UFLA 03-663 and UFLA 03-502 showed intermediate values (Table1). The lowest values found were for the plants inoculated with the strains UFLA 03-554, UFLA 03-545, UFLA 03-671, UFLA 03-584, UFLA 03-660, UFLA 03-649, UFLA 03-661, UFLA 03-662, UFLA 03-665, UFLA 03-703, UFLA 03-704, UFLA 03-683, UFLA 03-689, UFLA 03-500, UFLA 03-680, UFLA 03-672, UFLA 03-684, UFLA 03-678, UFLA 03-637, UFLA 03-626, UFLA 03-629, and UFLA 03-84.

For evaluation of the efficiency of the strains in fixing nitrogen (taking the chlorophyll content measured by SPAD into consideration), the control with high concentration of nitrogen, the reference strain UFLA 03-84, and the strains UFLA 03-660, UFLA 03-502, UFLA 03-584, UFLA 03-683, UFLA 03-661, UFLA 03-703, UFLA 03-554, UFLA 03-689, UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-637, UFLA 03-704, UFLA 03-684, UFLA 03-663, UFLA 03-680, UFLA 03-500, and UFLA 03-671 had the highest values (statistical group “a”), indicating that the strains were efficient in N fixation. Among the strains that had the highest values of SPAD, UFLA 03-502 and UFLA 03-663 showed the highest values of SDM. However, the results of the other strains obtained with the SPAD index was not reflected in the SDM values, which

may be related to the short time of conducting the experiment, not allowing conversion of the fixed N into dry matter. This was also observed by Jaramillo et al. (2013).

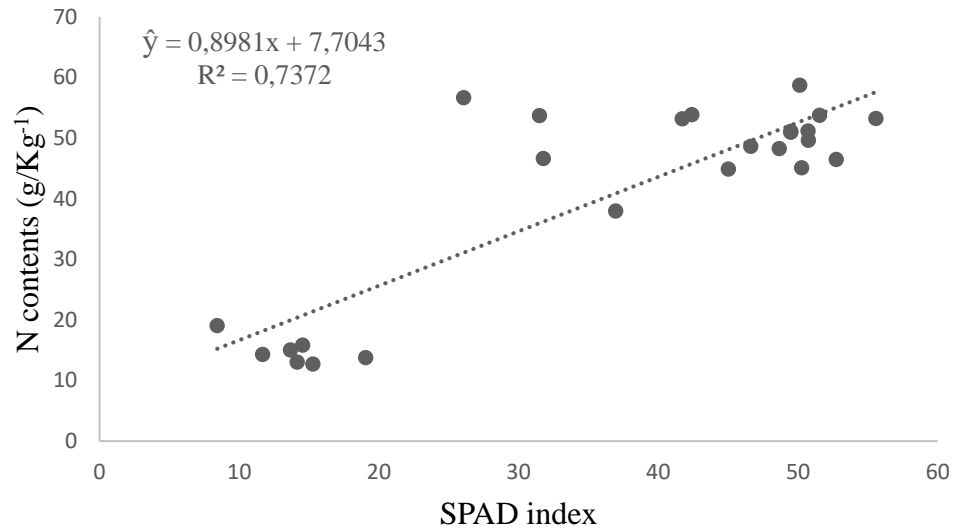
The strains UFLA 03-545, UFLA 03-629, UFLA 03-626, UFLA 03-665, UFLA 03-678, and UFLA 03-649 that did not nodulate or had the lowest values of NDM, together with the control with low nitrogen concentration, had the lowest values (statistical group “b”), which indicates that these strains are inefficient in fixing nitrogen.

Except for the strains UFLA 03-545 and UFLA 03-678, the *Bradyrhizobium* strains tested in this study were able to nodulate cowpea plants, and most were efficient in fixing N₂. The results indicate that mining areas, such as the iron mining area, can contain efficient strains. De Oliveira-Longatti et al. (2014) also identified strains with high nitrogen fixing capacity in symbiosis with cowpea in a bauxite mining area. In addition, the authors found that they are able to tolerate high aluminum content and pH between 5 and 6.8. Among the strains with high N₂-fixing efficiency are UFLA 3-164 and 3-153, recently described as a new species of *B. uaiense* (MICHEL et al., 2020) that showed efficiency greater than that of strains approved by MAPA as cowpea inoculants in 7 field experiments (OLIVEIRA et al., 2020). These results show the biotechnological potential of biodiversity in Fe mining areas.

According to Malavolta, Vitti and Oliveira (1997), the reference values for the leaf N contents in bean from 3 to 5 dag kg⁻¹ (30 to 50 g kg⁻¹). Considering leaf N contents means in inoculated treatments was 36.85 g kg⁻¹ and treatment with mineral N was 45 g kg⁻¹, generally, FBN was sufficient to reach this reference level. The work of Michel et al. (2018), evaluation of the foliar N contents in cowpea grown in vases with soil and obtained values of 34.4 g kg⁻¹ for the inoculated treatments and 77 g kg⁻¹ for the treatments fertilized with N.

In figure 1, observed high correlation ($r=0.86$) between the leaf N content and the SPAD index. This indicates that as the N content in leaves increases, the chlorophyll content measured by the SPAD index also increases. This positive correlation was also observed by Carvalho et al. (2003) in feijoeiro, where the concentration of chlorophyll correlates positively with the N contents in the leaf and with the productivity of crops. Leonardo et al. (2013) also verified that the SPAD index has direct correlation with the N contents in the leaf in abacaxi. This indicates the possibility of using the chlorophyllometer, to help assess the nutritional status of plants in relation to N more fast.

Figure 1 - Correlation N content and SPAD index in cowpea leaves

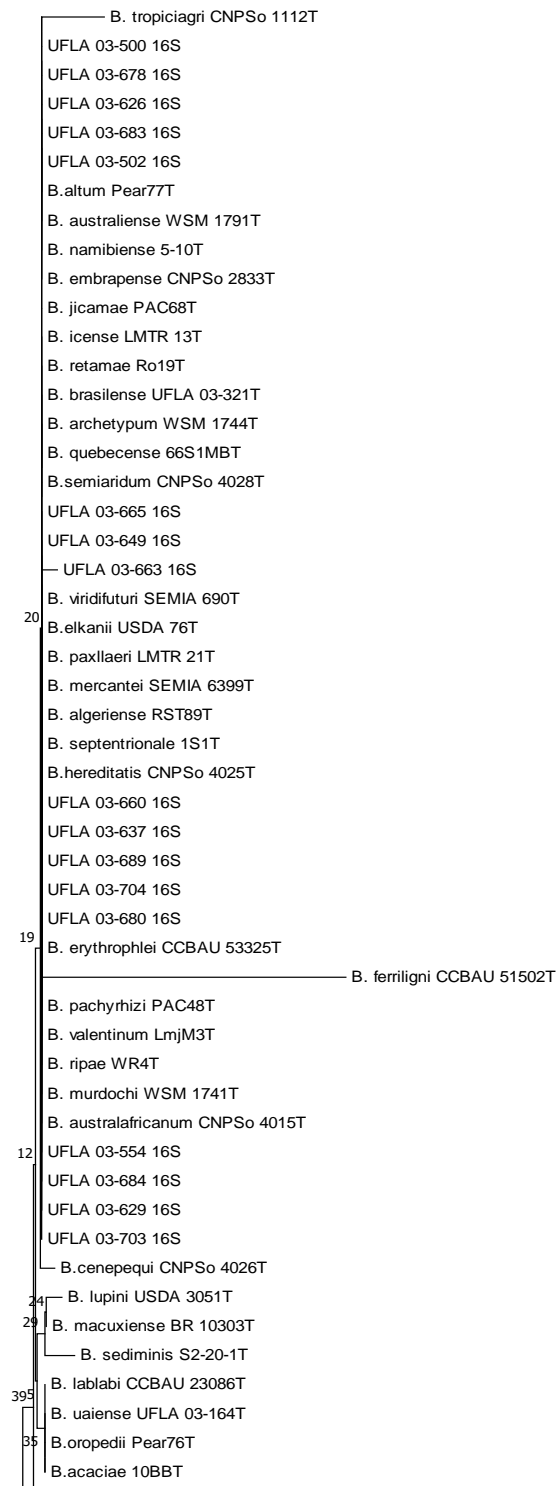


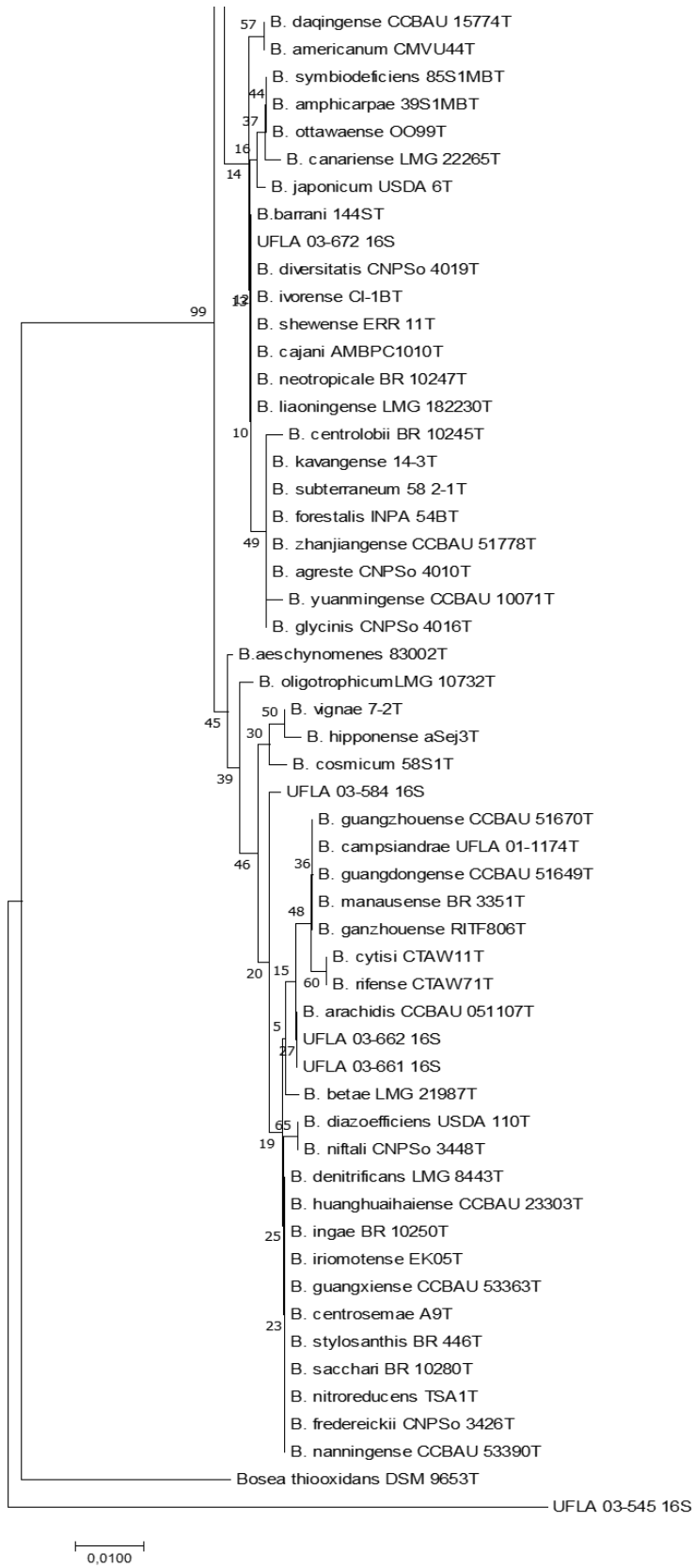
Source: Author (2023)

Partial sequencing of the 16S rRNA gene and *housekeeping* genes

The sequences of the 16S rRNA gene of the strains used in this study were evaluated through the BLASTn tool, which corroborated that all belong to the *Bradyrhizobium* genus and show considerable diversity. Partial sequences of the 16S rRNA gene were used to construct two phylogenetic trees. In figure 2, the sequences of all strains under study were used. Phylogenetic analysis of this gene showed that the strains UFLA 03-661, UFLA 03-662, UFLA 502 and UFLA 03-584 were in positions separate from the *Bradyrhizobium* species described, just as UFLA 03-672. The other UFLA strains joined clusters of species already described.

Figure 2 - Phylogenetic tree of the 23 *Bradyrhizobium* strains under analysis based on the 16S rRNA (582 bp) gene. The Mega 7.0 program was used. The statistical method applied was Neighbor Joining. To certify the results found in the statistics, a bootstrap with 1000 repetitions was used. In the nodes are the value in percentage of how much grouped together are the strains. The species *Bosea thiooxidans* is the outgroup (continue).



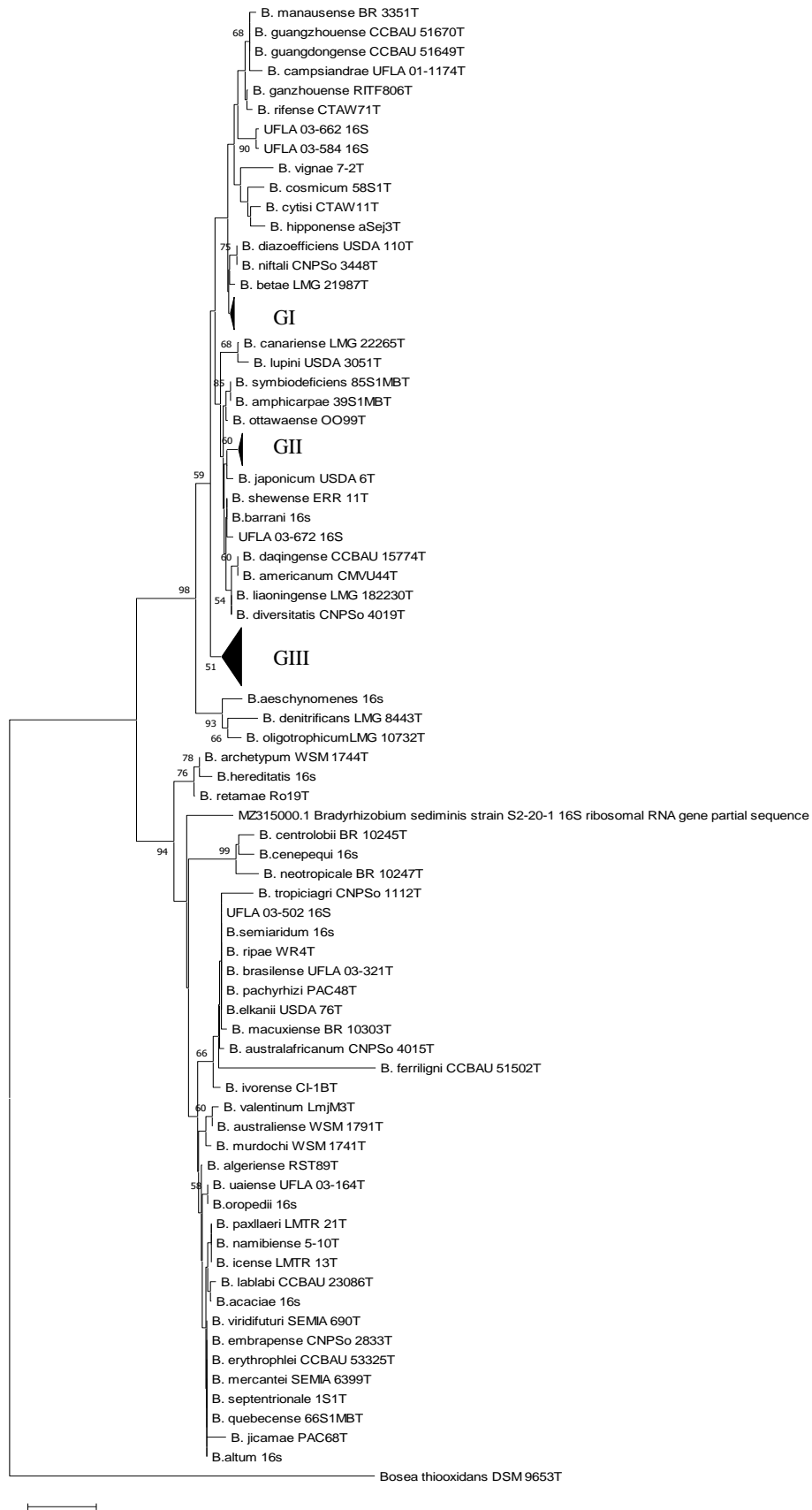


(Conclusion)

Source: Author (2023)

The tree presented in Figure 3 was built based on larger sequences of the 16S rRNA gene of four strains. Thus, more accurate information would be possible for its positioning. The UFLA 03-502 strain grouped with *B. semiaridum*, *B. ripae*, *B. brasilense* and presented 100% similarity with them. The UFLA strain 03-662 learned 99.9% similarity with UFLA 03-584. The type strain that presented the highest similarity was *B. rifense* (99.5%). Strain UFLA 03-672 clustered closely with *B. shewense* and *B. barrani*, and showed 99.9% similarity to these strains. Table 2 presents the similarity data between the *Bradyrhizobium* type strains.

Figure 3 - Phylogenetic tree of the 4 strains (UFLA 03-584, UFLA 03-662, UFLA 03-672 and UFLA 03-502) under analysis based on the 16S rRNA gene. The Mega 7.0 program was used. Groups GI, GII and GIII contain the described species of *Bradyrhizobium* and did not include strains from the Iron Quadrangle. The statistical method applied was Neighbor Joining. To certify the results found in the statistics, a bootstrap with 1000 repetitions was used. In the nodes are the value in percentage of how much grouped together are the strains. The species *Bosea thiooxidans* is the outgroup.



Source: Author (2023)

Table 2 - Similarity between strains UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-502 and other strains of species of the genus *Bradyrhizobium* of the 16S rRNA gene (continue).

Strains	16S rRNA gene		
	UFLA 03-502	UFLA 03-662	UFLA 03-672
<i>B. manausense</i> (BR_3351 ^T)	97,0	99,4	99,1
<i>B. guangzhouense</i> (CCBAU_51670 ^T)	97,1	99,5	99,2
<i>B. guangdongense</i> (CCBAU_51649 ^T)	97,1	99,5	99,2
<i>B. campsiantrae</i> (UFLA_01-1174 ^T)	96,9	99,3	99,0
<i>B. ganzhouense</i> (RITF806 ^T)	97,1	99,5	99,2
<i>B. rifense</i> (CTAW71 ^T)	97,1	99,5	99,2
UFLA 03-662	96,9	100,0	99,1
UFLA 03-584	96,9	99,9	99,1
<i>B. vignae</i> (7-2 ^T)	96,7	99,1	98,9
<i>B. cosmicum</i> (58S1 ^T)	96,9	99,2	99,0
<i>B. cytisi</i> (CTAW11 ^T)	96,9	99,2	99,0
<i>B. hipponense</i> (aSej3 ^T)	96,8	99,2	99,0
<i>B. diazoefficiens</i> (USDA_110 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. niftali</i> (CNPSo_3448 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. betae</i> (LMG 21987 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. nitroreducens</i> (TSA1 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. frederickii</i> (CNPSo_3426 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. guangxiense</i> (CCBAU_53363 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. centrosemae</i> (A9 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. nanningense</i> (CCBAU_53390 ^T)	97,3	99,4	99,4
<i>B. canariense</i> (LMG_22265 ^T)	97,2	99,0	99,5
<i>B. lupine</i> (USDA_3051 ^T)	97,1	98,9	99,4
<i>B. symbiodeficiens</i> (85S1MB ^T)	97,4	99,1	99,7
<i>B. amphicarpace</i> (39S1MB ^T)	97,4	99,1	99,7
<i>B. ottawaense</i> (OO99 ^T)	97,4	99,2	99,8
<i>B. agreste</i> (CNPSo_4010 ^T)	97,1	98,8	99,5
<i>B. glycinis</i> (CNPSo_4016 ^T)	97,1	98,8	99,5
<i>B. yuanmingense</i> (CCBAU_10071 ^T)	96,9	98,7	99,3
<i>B. subterraneum</i> (58_2-1 ^T)	97,2	99,0	99,6
<i>B. forestalis</i> (INPA_54B ^T)	97,2	99,0	99,6
<i>B. japonicum</i> (USDA_6 ^T)	97,3	99,1	99,7
<i>B. shewense</i> (ERR_11 ^T)	97,4	99,2	99,9
<i>B. barrani</i>	97,4	99,2	99,9
UFLA 03-672	97,3	99,1	100,0
<i>B. daqingense</i> (CCBAU 15774 ^T)	97,2	99,0	99,7

<i>B. americanum</i> (CMVU44 ^T)	97,2	99,0	99,7
<i>B. liaoningense</i> (LMG_182230 ^T)	97,3	99,1	99,8
<i>B. diversitatis</i> CNPSo_4019 ^T)	97,3	99,1	99,8
<i>B. cajani</i> (AMBPC1010 ^T)	97,2	98,8	99,2
<i>B. stylosanthis</i> (BR_446 ^T)	97,2	98,9	99,2
<i>B. arachidis</i> (CCBAU_051107 ^T)	97,2	98,8	99,2
<i>B. huanghuaihaiense</i> (CCBAU_23 ^T)	97,2	98,8	99,2
<i>B. kavangense</i> (14-3 ^T)	96,8	98,5	98,8
<i>B. zhanjiangense</i> (CCBAU_51778 ^T)	96,8	98,5	98,8
<i>B. ingae</i> (BR_10250 ^T)	96,8	98,4	98,8
<i>B. iriomotense</i> (EK05 ^T)	96,8	98,4	98,8
<i>B. sacchari</i> (BR_10280 ^T)	96,8	98,4	98,8
<i>B. aeschynomenes</i>	97,2	98,4	98,8
<i>B. denitrificans</i> (LMG_8443 ^T)	97,0	98,2	98,5
<i>B. oligotrophicum</i> (LMG_10732 ^T)	97,2	98,4	98,8
<i>B. archetypum</i> (WSM_1744 ^T)	98,9	97,3	97,6
<i>B. hereditatis</i>	98,7	97,1	97,5
<i>B. retamae</i> (Ro19 ^T)	99,0	97,3	97,7
<i>B. sediminis</i>	98,8	96,8	97,2
<i>B. centrolobii</i> (BR_10245 ^T)	98,6	96,5	96,9
<i>B. cenepequi</i>	98,5	96,5	96,8
<i>B. neotropicale</i> (BR_10247 ^T)	98,5	96,4	96,8
<i>B. tropiciagri</i> (CNPSo_1112 ^T)	99,5	96,5	96,8
UFLA 03-502	100,0	96,9	97,3
<i>B. semiaridum</i>	100,0	96,9	97,3
<i>B. ripae</i> (WR4 ^T)	100,0	96,9	97,3
<i>B. brasilense</i> (UFLA_03-321 ^T)	100,0	96,9	97,3
<i>B. pachyrhizi</i> (PAC48 ^T)	100,0	96,9	97,3
<i>B. elkanii</i> (USDA_76 ^T)	100,0	96,9	97,3
<i>B. macuxiense</i> (BR_10303 ^T)	99,9	96,9	97,2
<i>B. australafricanum</i> (CNPSo_4015 ^T)	99,9	96,9	97,3
<i>B. ferriligni</i> (CCBAU_51502 ^T)	97,7	94,7	95,1
<i>B. ivorensis</i> (CI-1B ^T)	99,8	97,0	97,3
<i>B. valentinum</i> (LmjM3 ^T)	99,3	97,0	97,4
<i>B. australiense</i> WSM_1791 ^T)	99,4	97,1	97,5
<i>B. murdochi</i> (WSM_1741 ^T)	99,4	97,1	97,5
<i>B. algeriense</i> (RST89 ^T)	99,6	97,2	97,6
<i>B. uaiense</i> (UFLA_03-164 ^T)	99,5	97,2	97,5
<i>B. oropedii</i>	99,5	97,2	97,5
<i>B. paxllaeri</i> (LMTR_21 ^T)	99,4	97,1	97,5
<i>B. namibiense</i> (5-10 ^T)	99,4	97,1	97,5

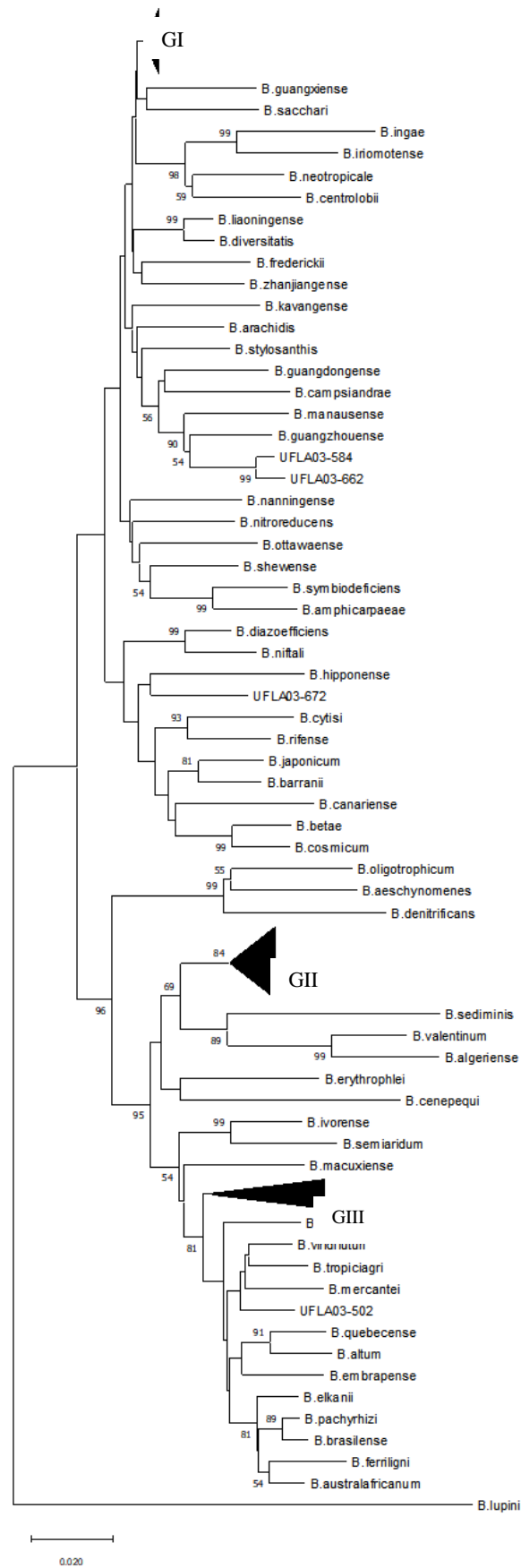
<i>B. icense</i> (LMTR_13 ^T)	99,4	97,1	97,5
<i>B. lablabi</i> (CCBAU_23086 ^T)	99,4	97,0	97,4
<i>B. acaciae</i>	99,4	97,1	97,5
<i>B. viridifuturi</i> (SEMIA_690 ^T)	99,5	97,2	97,5
<i>B. embrapense</i> (CNPSO_2833 ^T)	99,5	97,2	97,5
<i>B. erythrophlei</i> (CCBAU_53325 ^T)	99,5	97,2	97,5
<i>B. mercantei</i> (SEMIA_6399 ^T)	99,5	97,2	97,5
<i>B. septentrionale</i> (1S1 ^T)	99,5	97,2	97,5
<i>B. quebecense</i> (66S1MB ^T)	99,5	97,2	97,5
<i>B. jicamae</i> (PAC68 ^T)	99,2	96,9	97,3
<i>B. altum</i>	99,5	97,2	97,5

(Conclusion)

Source: Author (2023)

In order to obtain an analysis with more precise information, the MLSA was performed. Two trees were built from the concatenation of housekeeping genes. The first (Fig 4) was concatenated using the *housekeeping* genes *recA*, *gyrB* and *rpoB*. Strains UFLA 03-584 and UFLA 03-662 remained close and strains *B. guangzhouense* and *B. manauense*. Strain UFLA 03-502 clustered with strains *B. viridifuturi* (97.4% similarity) *B. tropiciagri* and *B. mercantei*. Strain UFLA 03-672 showed similarity of 94.3% with *B. barrani*, and clustered with *B. hipponense* and *B. japonicum*. Table 3 shows the similarity between the strains.

Figure 4 - Phylogenetic tree concatenated with *recA*, *gyrB* and *rpoB* genes (1242 pb). Groups GI, GII and GIII contain the described species of *Bradyrhizobium* and did not include strains from the Iron Quadrangle. The program used was Mega 7.0 to build the tree and the statistical method used was Neighbor Joining with a bootstrap of 1000 repetitions. The values in the nodes refer to the grouping of species (%).



Source: Author (2023)

Table 3 - Similarity between strains UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-502 and other strains of species of the genus *Bradyrhizobium* concatenation of *recA*, *gyrB* and *rpoB* genes (continue).

Strains	Concatenation of <i>recA</i> , <i>gyrB</i> and <i>rpoB</i> genes		
	UFLA 03-502	UFLA 03-662	UFLA 03-672
<i>B.agreste</i>	89,7	92,3	92,2
<i>B.glycinis</i>	89,7	92,2	92,1
<i>B.yuanmingense</i>	90,3	92,9	92,7
<i>B.subterraneum</i>	89,6	92,2	92,1
<i>B.forestalis</i>	90,0	92,6	92,4
<i>B.vignae</i>	90,3	92,9	92,8
<i>B.cajani</i>	90,8	93,3	93,2
<i>B.daqingense</i>	90,4	92,9	92,8
<i>B.huanghuaihaiense</i>	90,0	92,6	92,5
<i>B.guangxiense</i>	90,3	92,9	92,7
<i>B.sacchari</i>	90,2	92,8	92,7
<i>B.ingae</i>	87,4	89,9	89,8
<i>B.iriomotense</i>	88,3	90,9	90,7
<i>B.neotropiale</i>	89,6	92,2	92,0
<i>B.centrolobii</i>	89,2	91,8	91,6
<i>B.liaoningense</i>	91,4	94,0	93,8
<i>B.diversitatis</i>	91,4	93,9	93,8
<i>B.frederickii</i>	90,5	93,0	92,9
<i>B.zhanjiangense</i>	90,6	93,2	93,0
<i>B.kavangense</i>	90,3	93,1	92,7
<i>B.arachidis</i>	91,1	94,2	93,6
<i>B.stylosanthis</i>	91,0	94,3	93,4
<i>B.guangdongense</i>	90,0	94,2	92,5
<i>B.campsiandrae</i>	89,5	93,7	91,9
<i>B.manausense</i>	89,5	95,0	92,0
<i>B.guangzhouense</i>	89,9	95,6	92,4
UFLA03-584	89,9	98,9	92,3
UFLA03-662	89,6	100,0	92,1
<i>B.nanningense</i>	90,7	93,0	93,1
<i>B.nitroreducens</i>	90,9	93,2	93,3
<i>B.ottawaense</i>	90,3	92,6	92,7
<i>B.shewense</i>	90,8	93,1	93,2
<i>B.symbiodeficiens</i>	89,5	91,8	92,0
<i>B.amphicarphaeae</i>	89,3	91,6	91,8

<i>B.diazoeficiens</i>	90,9	92,5	94,3
<i>B.niftali</i>	90,3	91,9	93,7
<i>B.hipponense</i>	89,1	90,7	93,9
UFLA 03-672	90,5	92,1	100,0
<i>B.cytisi</i>	89,4	90,9	93,5
<i>B.rifense</i>	89,9	91,5	94,0
<i>B.japonicum</i>	90,1	91,7	94,2
<i>B.barranii</i>	90,2	91,7	94,3
<i>B.canariense</i>	88,9	90,5	93,0
<i>B.betae</i>	89,4	91,0	93,5
<i>B.cosmicum</i>	89,5	91,0	93,6
<i>B.oligotrophicum</i>	89,6	88,2	89,1
<i>B.aeschynomenes</i>	89,5	88,1	89,0
<i>B.denitrificans</i>	88,8	87,4	88,3
<i>B.retamae</i>	89,2	85,9	86,7
<i>B.murdochi</i>	89,7	86,3	87,2
<i>B.icense</i>	89,8	86,5	87,4
<i>B.australiense</i>	89,6	86,3	87,2
<i>B.archetypum</i>	89,4	86,0	86,9
<i>B.lablabi</i>	90,7	87,3	88,2
<i>B.jicamae</i>	90,3	87,0	87,9
<i>B.paxllaeri</i>	90,1	86,8	87,7
<i>B.namibiense</i>	90,6	87,3	88,2
<i>B.hereditatis</i>	88,6	85,3	86,2
<i>B.sediminis</i>	89,4	86,0	86,9
<i>B.valentinum</i>	90,2	86,9	87,7
<i>B.algeriense</i>	89,4	86,1	86,9
<i>B.erythrophlei</i>	92,3	89,0	89,9
<i>B.cenepequi</i>	90,3	87,0	87,9
<i>B.ivorense</i>	94,2	89,4	90,3
<i>B.semiaridum</i>	93,3	88,5	89,4
<i>B.macuxiense</i>	94,4	89,4	90,2
<i>B.uaiense</i>	95,5	89,6	90,5
<i>B.oropedii</i>	94,9	88,9	89,8
<i>B.acaciae</i>	95,5	89,5	90,4
<i>B.septentrionale</i>	94,8	88,9	89,8
<i>B.ripae</i>	96,4	89,5	90,3
<i>B.viridifuturi</i>	97,4	89,7	90,5
<i>B.tropiciagri</i>	97,0	89,3	90,2
<i>B.mercantei</i>	96,6	88,9	89,8
UFLA 03-502	100,0	89,6	90,5

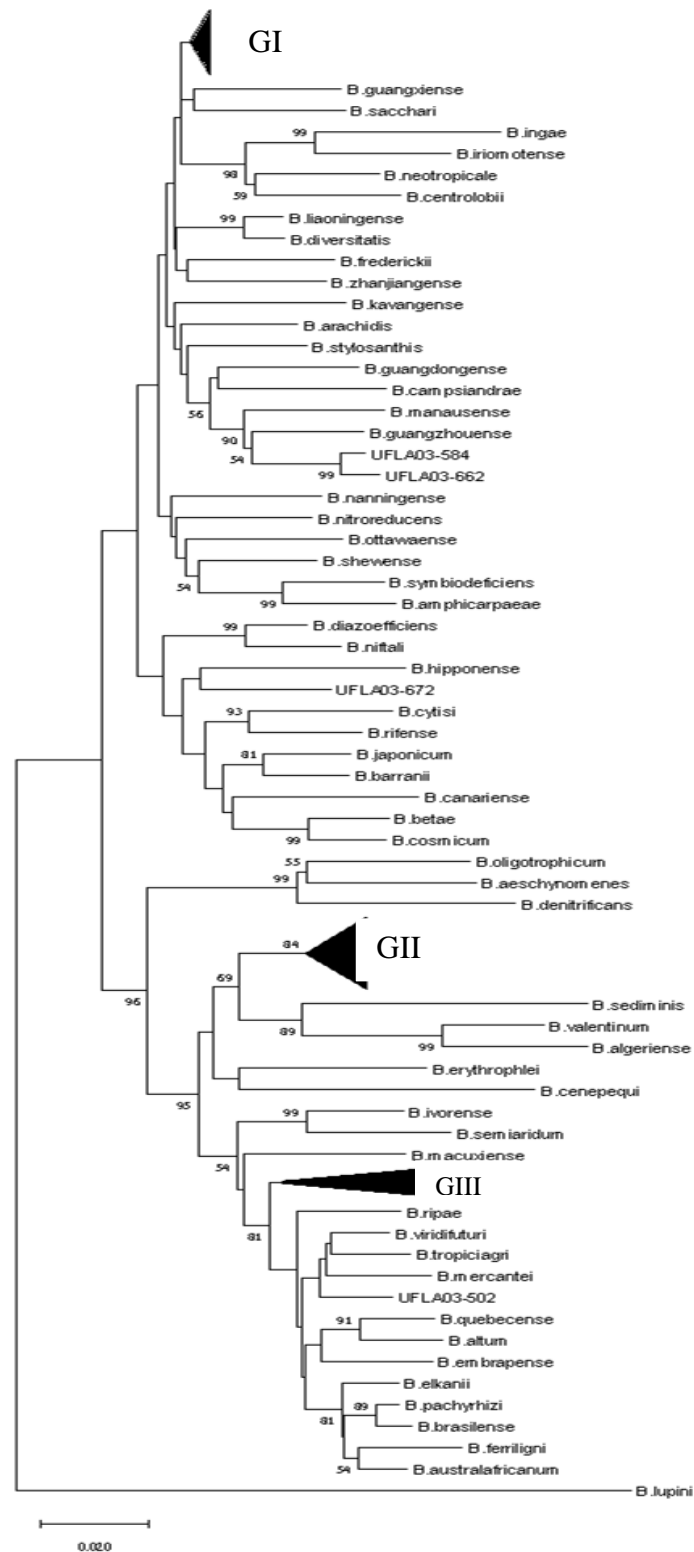
<i>B.quebecense</i>	95,9	88,8	89,7
<i>B.altum</i>	95,8	88,7	89,6
<i>B.embrapense</i>	96,0	88,9	89,8
<i>B.elkanii</i>	96,6	89,5	90,4
<i>B.pachyrhizi</i>	96,6	89,5	90,4
<i>B.brasilense</i>	96,4	89,3	90,1
<i>B.ferriligni</i>	95,4	88,3	89,2
<i>B.australaffricanum</i>	96,4	89,3	90,2
<i>B.lupini</i>	81,9	82,1	83,0

(Conclusion)

Source: Author (2023)

The second concatenated tree (Fig. 5) was made using the *housekeeping* genes *recA*, *glnII* and *atpD*. Strains UFLA 03-584 and UFLA 03-662 remained close and strain UFLA 03-662 showed 96.1% similarity with *B. stylosanthis*. Strain UFLA 03-672 clustered closely to the type strain *B. semiaridum* and showed similarity of 95.1%. Strain UFLA 03-502 showed 97% similarity with *B. australaffricanum*. Table 4 shows the similarity values between the study strains and the type strains.

Figure 5 - Phylogenetic tree concatenated with *recA*, *glnII* and *atpD* genes (1245 pb). Groups GI, GII and GIII contain the described species of *Bradyrhizobium* and did not include strains from the Iron Quadrangle. The program used was Mega 7.0 to build the tree and the statistical method used was Neighbor Joining with a bootstrap of 1000 repetitions. The values in the nodes refer to the grouping of species (%).



Source: Author (2023)

Table 4 - Similarity between strains UFLA 03-662, UFLA 03-672, UFLA 03-502 and other strains of species of the genus *Bradyrhizobium* concatenation of *recA*, *glnII* and *atpD* genes (continue).

Strains	Concatenation of <i>recA</i> , <i>glnII</i> and <i>atpD</i> genes		
	UFLA 03-502	UFLA 03-662	UFLA 03-672
<i>B.japonicum</i>	90,9	94,6	93,5
<i>B.barranii</i>	90,4	94,1	93,0
<i>B.diazoeficiens</i>	91,1	94,7	93,7
<i>B.niftali</i>	90,5	94,1	93,1
<i>B.betae</i>	90,7	94,4	93,1
<i>B.cosmicum</i>	90,5	94,1	31,0
<i>B.ottawaense</i>	90,6	94,2	93,2
<i>B.shewense</i>	90,8	94,4	93,4
<i>B.symbiodeficiens</i>	90,3	93,9	92,9
<i>B.amphicarpaeae</i>	90,2	93,8	92,8
<i>B.stylosanthis</i>	92,2	96,1	94,8
<i>B.campsiandrae</i>	91,2	95,1	93,8
<i>B.huanghuaihaiens</i>	91,4	95,2	94,0
UFLA 03-584	91,6	98,9	94,2
UFLA 03-662	91,6	100,0	94,2
<i>B.ganzhouense</i>	90,6	95,3	93,2
<i>B.rifense</i>	90,9	95,6	93,5
<i>B.canariense</i>	90,5	95,2	93,1
<i>B.cytisi</i>	89,8	94,5	92,4
<i>B.manausense</i>	90,9	94,3	93,5
<i>B.sacchari</i>	90,9	94,3	93,5
<i>B.arachidis</i>	91,8	95,2	94,4
<i>B.daqingense</i>	90,4	93,8	93,0
<i>B.americanum</i>	90,9	94,3	93,5
<i>B.cajani</i>	90,6	94,0	93,2
<i>B.zhanjiangense</i>	90,7	94,1	93,3
<i>B.neotropicale</i>	90,7	94,1	93,3
<i>B.centrolobii</i>	90,9	94,2	93,5
<i>B.kavangense</i>	90,8	94,2	93,4
<i>B.subterraneum</i>	90,3	93,7	92,9
<i>B.forestalis</i>	90,6	94,0	93,2
<i>B.yuanmingense</i>	90,8	94,2	93,4
<i>B.vignae</i>	90,7	94,1	93,3
<i>B.agreste</i>	90,4	93,8	93,0

<i>B.glycinis</i>	90,6	94,0	93,2
<i>B.nitroreducens</i>	91,3	94,7	93,9
<i>B.guangxiense</i>	91,0	94,4	93,6
<i>B.centrosemae</i>	91,0	94,4	93,6
<i>B.nanningense</i>	90,2	93,6	92,8
<i>B.guangdongense</i>	90,4	93,7	93,0
<i>B.guangzhouense</i>	90,6	94,0	93,2
<i>B.frederickii</i>	91,3	94,6	93,9
<i>B.liaoningense</i>	91,5	94,8	94,1
<i>B.diversitatis</i>	91,1	94,4	93,7
<i>B.hipponense</i>	90,3	93,0	93,6
<i>B.ingae</i>	90,8	93,5	94,3
<i>B.iriomotense</i>	90,3	93,0	93,8
<i>B.semiaridum</i>	90,3	93,1	95,1
UFLA 03-672	91,4	94,2	100,0
<i>B.denitrificans</i>	88,6	89,0	88,9
<i>B.oligotrophicum</i>	87,9	88,3	88,2
<i>B.aeschynomenes</i>	89,2	89,6	89,5
<i>B.ivorense</i>	93,8	91,4	91,3
<i>B.macuxiense</i>	94,9	91,2	91,0
<i>B.oropedii</i>	94,7	90,5	90,4
<i>B.acaciae</i>	94,7	90,5	90,4
<i>B.uaiense</i>	95,0	90,9	90,7
<i>B.mercantei</i>	95,9	91,7	91,5
<i>B.viridifuturi</i>	95,7	91,5	91,3
<i>B.septentrionale</i>	96,2	91,7	91,6
<i>B.quebecense</i>	95,6	90,7	90,6
<i>B.altum</i>	95,6	90,7	90,6
<i>B.embrapense</i>	96,1	91,2	91,1
<i>B.tropiciagri</i>	96,3	91,4	91,3
<i>B.elkanii</i>	96,6	91,3	91,2
UFLA 03-502	100,0	91,6	91,4
<i>B.australafricanum</i>	97,0	91,3	91,2
<i>B.pachyrhizi</i>	96,4	90,7	90,6
<i>B.brasilense</i>	96,7	90,9	90,8
<i>B.cenepequi</i>	89,6	90,3	90,2
<i>B.sediminis</i>	86,7	87,4	87,3
<i>B.namibiense</i>	89,6	90,3	90,2
<i>B.archetypum</i>	89,3	90,0	89,9
<i>B.hereditatis</i>	89,3	90,0	89,8
<i>B.valentinum</i>	88,0	88,7	88,5

<i>B.algeriense</i>	89,6	90,3	90,2
<i>B.jicamae</i>	89,6	90,3	90,2
<i>B.paxllaeri</i>	89,2	89,9	89,7
<i>B.lablabi</i>	90,4	91,0	90,9
<i>B.australiense</i>	89,7	90,3	90,2
<i>B.icense</i>	89,8	90,5	90,4
<i>B.retamae</i>	89,1	90,5	89,6
<i>B.murdochi</i>	89,4	90,1	89,9

(conclusion)

Source: Author (2023)

The MLSA technique was important as it complemented the information for a better understanding and definition of the tested strains. This technique is important because it helps in phylogenetic analyzes of the genus *Bradyrhizobium* (MARTENS et al., 2007; STEPKOWSKI et al., 2005).

Although the 16S rRNA gene is quite conserved, only allowing identification at the genus level, this gene has still been widely used in phylogenetic studies of the *Bradyrhizobium* genus (FLORENTINO et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012; SILVA et al., 2012; WILLEMS et al., 2001). Although this gene is used as an initial tool for the phylogeny of bacteria, as it is highly conserved, its use makes it difficult to distinguish closely related species. Therefore, it is necessary to use less conserved genes so that there is a better positioning of the strains under study.

Cowpea is an extensively studied legume widely used as a trap plant, due to its ability to establish symbiotic relationships with bacteria. This species is able to form nodules and fix nitrogen in an efficient manner with some bacterial genera such as *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* (GUIMARÃES et al., 2012), coexisting with other endophytic bacteria.

Bacteria of the *Bradyrhizobium* genus are among the strains isolated with greatest frequency from cowpea nodules, showing a wide diversity of species, as already reported by various authors (GUIMARÃES et al., 2012; LEITE et al., 2017; MAQUIA et al., 2020; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; NDUNGUA et al., 2018; PULE-MEULENBERG et al., 2010).

Some *Bradyrhizobium* strains are already recommended by MAPA as cowpea inoculants: UFLA 03-84, INPA 03-11B, BR3267, and BR3262 (BRASIL, 2011). The INPA 03-11B strain was identified as *Bradyrhizobium elkanii* (GUIMARÃES et al., 2015), the BR 3267 strain as *Bradyrhizobium yuanmingense*, the BR 3262 strain as *Bradyrhizobium pachyrhizi* (LEITE et al., 2017), and the UFLA 03-84 strain as *Bradyrhizobium viridifuturi*

(COSTA et al., 2019). The identification and selection of strains that establish symbiosis with cowpea is important for reducing the use of nitrogen fertilizers, reducing production costs, and improving environmental quality.

The study of Michel et al. (2020) described the species *Bradyrhizobium uaiense*, isolated from nodules of cowpea grown in soils of a bauxite mining area in Brazil. In that study, average nucleotide identity (ANI) analysis was determined (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005), which has been used in some studies for identifying new bacterial species (COSTA et al., 2017) since the use of genomes has proven to be a more reliable alternative for identification of rhizobia, along with other criteria (DE LAJUDIE et al., 2019).

The position of the strains UFLA 03-661, UFLA 03-662, and UFLA 03-584 indicate that they may be a new species. Another noteworthy strain is UFLA 03-672, which showed an evolutionary difference from the *Bradyrhizobium* strains already described. These data suggest that these strains may be new species of this genus. This was corroborated by average nucleotide identity (ANI) analysis.

Average nucleotide identity (ANI)

The ANI determined for comparison between the genome of the type species of *Bradyrhizobium* and the strains under study ranged from 75% to 95% for the strain UFLA 03-502, from 75% to 91% for the strain UFLA 03-584, from 74% to 91% for the strain UFLA 03-662, and from 74% to 90% for the strain UFLA 03-672 (SUPPLEMENT A, B, C, D). Table 5 indicates the ANI values obtained and the nearest type species of the strains under study.

Considering that normally the cut-off values between genomes of the same species are above 95-96% (GORIS et al., 2007; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009), the ANI between the 4 strains under study indicated that the strains UFLA 03-584 and UFLA 03-662 may be the same species, because the ANI had a value of 98% between them. In addition, the two strains had an ANI value of 91% with *Bradyrhizobium rifense*, an isolate from nodules of *Cytisus villosus* in Morocco (CHAHBOUNE et al., 2012). The strain UFLA 03-672 is a genomically different species. The strain UFLA 03-502 presented a similarity value of 95% with the species *Bradyrhizobium tropiciagri* (SEMIA 6148^T), isolated from *Neonotonia wightii* in Brazil (DELAMUTA et al., 2015), so it also represents a new species.

Table 5 - ANI of genomic sequences of the strains UFLA 03-502, UFLA 03-584, UFLA 03-662, and UFLA 03-672 related type species.

Strain under study	% ANI	Type strain
UFLA 03-502	95%	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T
UFLA 03-584	91%	<i>Bradyrhizobium rifense</i> CTAW71 ^T
UFLA 03-662	91%	<i>Bradyrhizobium rifense</i> CTAW71 ^T
UFLA 03-672	90%	<i>Bradyrhizobium lupini</i> USDA 3051 ^T
	90%	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 ^T

The ANI values were obtained using the Enveomics collection (Rodriguez-R & Konstantinidis, 2016).

Source: Author (2023)

For the description of the species *B. shewense*, the authors obtained an ANI value of 95% below the cut-off value (96%) and therefore considered it as a new species (ASERSE et al., 2017). The results obtained for the similarity of the housekeeping genes associated with the ANI values found for the strains under study, demonstrate that these may be new species, since the cutoff value for ANI is 96% (Varghese et al., 2015) and all strains studied have a value below this value. Therefore, strain UFLA 03-502 can also be considered a possible new species.

The sequences were deposited in NCBI's GenBank under the following accession numbers: UFLA 03-662 (JAUPJR0000000000), UFLA 03-502 (JAUPJQ0000000000), UFLA 03-584 (JAUPJP0000000000), only the UFLA 03-672 strain does not have the number access.

4 CONCLUSIONS

The *Bradyrhizobium* strains, except for the strains UFLA 03-678 and UFLA 03-545, are able to nodulating and promote vegetative growth in cowpea. The UFLA 03-502 and UFLA 03-663 strains stood out in promoting a high SDM value and are more efficient in N₂ fixation.

The analysis of the Average Nucleotide Identity of the strains genome and the Multilocus Sequence Analysis of the *housekeeping* genes, showed that strains UFLA 03-584, UFLA 03-672, UFLA 03-502 and UFLA 03-662 represent new species of bacteria of the genus *Bradyrhizobium*.

REFERENCES

- ASERSE, A. A. *et al.* Draft genome sequences of *Bradyrhizobium shewense* sp. nov. ERR11 T and *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071 T. **Standards in genomic sciences**, v. 12, p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0283-x>.
- BANKEVICH, Anton *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011. Retrieved from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view> . Acessado em 27 de maio de 2022.
- CHAHBOUNE, R. *et al.* *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 302-305, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.06.001>
- CARVALHO, M. *et al.* Doses e épocas de aplicação de nitrogênio e teores foliares deste nutriente e de clorofila em feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 445-450, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000300006>
- CASTRO, J. L. *et al.* Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20160525>
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos Acomp. safra bras. grãos v.8**– Safra 2020/21, n.5 - Quinto levantamento, Brasília, p. 1-94. ISSN 2318-6852. fevereiro 2021.
- COSTA, E. M. *et al.* *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 1211-1221, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1390-1>
- COSTA, E. M. *et al.* Classification of the inoculant strain of cowpea UFLA 03-84 and of other strains from soils of the Amazon region as *Bradyrhizobium viridifuturi* (symbiovar tropici). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 335-345, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00045-x>
- 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**, v. 69, n. 7, p. 1852-1863, 2019. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>
- 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. Pt_12, p. 4424-4433, 2015. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000592>
- DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. *et al.* Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1239-1250, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1547-2>

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

FRED, E.B.; Waksman, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: John Wiley; 1928.

FLORENTINO, L. A. *et al.* Diversity and efficiency of Bradyrhizobium strains isolated from soil samples collected from around Sesbania virgata roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1113-1123, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000400011>

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. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64483-0>

GRÖNEMEYER, J. L. *et al.* *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. Pt_12, p. 4886-4894, 2015. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000666>

GRÖNEMEYER, J. L. *et al.* *Bradyrhizobium namibiense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of *Lablab purpureus*, hyacinth bean, in Namibia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 4884-4891, 2017.

GUIMARÃES, A. A. *et al.* Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, Sept. 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>

GUIMARÃES, A. A. *et al.* High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 433-441, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California; 1950. (Circular, 347).

KEBEDE, E.; BEKEKO, Z. Expounding the production and importance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Ethiopia. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1769805, 2020. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1769805>

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 7, p. 2567-2572, 2005.

KLEPA, M. S. *et al.* *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 005446, 2022. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005446>

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

- LEITE, J. *et al.* Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2064, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02064>
- LEONARDO, F. A. P. *et al.* Teor de clorofila e índice SPAD no abacaxizeiro cv. Vitória em função da adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 377-383, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000200006>
- MALAVOLTA, E. *et al.* Evaluation of plant nutrient status: principles and their application. **Evaluation of plant nutrient status: principles and their application.**, n. Ed. 2, 1997. Retrieved from:
- MAQUIA, I. S. *et al.* Mining the microbiome of key species from African savannawoodlands: Potential for soil health improvement and plant growth promotion. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1291, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091291>
- MARTENS, M. *et al.* Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 489-503, 2007. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64344-0>
- MICHEL, D. C. *et al.* Influence of Molybdenum doses in inoculation and mineral fertilization in cowpea beans. **Biosci. j.(Online)**, p. 102-112, 2020. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-42343>
- MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2a ed atual e rev. Lavras: Editora UFLA; 2006.
- NDUNGU, S. M. *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 261, p. 161-171, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.014>
- OLIVEIRA, D. P. *et al.* Selection of elite Bradyrhizobium strains by biometric techniques for inoculation in cowpea. *Soil Science Society of America Journal*, v. 84, n. 4, p. 1125-1138, 2020. <https://doi.org/10.1002/saj2.20084>
- PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome research**, v. 25, n. 7, p. 1043-1055, 2015. [10.1101/gr.186072.114](https://doi.org/10.1101/gr.186072.114)
- PEÑA, E. A.; SLATE, Elizabeth H. Global validation of linear model assumptions. **Journal of the American Statistical Association**, v. 101, n. 473, p. 341-354, 2006. <https://doi.org/10.1198/016214505000000637>
- PULE-MEULENBERG, F. *et al.* Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-89>
- R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2022. Retrieved from: <https://www.R-project.org/>.
- RICHTER, M. ; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126-19131, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>

RODRIGUEZ-R, Luis M.; KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. **PeerJ Preprints**, 2016. Retrieved from: <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>

RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA, 2022. Retrieved from: <http://www.rstudio.com/>.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SILVA, F. V. *et al.* Genetic diversity of Rhizobia isolates from Amazon soils using cowpea (*Vigna unguiculata*) as trap plant. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 682-691, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200033>

SPRENT, J. I. *et al.* Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017. <https://doi.org/10.1111/nph.14474>

STEPKOWSKI, T. *et al.* European origin of Bradyrhizobium populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7041-7052, 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7041-7052.2005>

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. **Mol Biol Evol**, v. 9, n. 4, p. 678-687, 1992. Retrieved from: https://www.researchgate.net/profile/Koichiro-Tamura/publication/21526039_Estimation_of_the_number_of_nucleotide_substitutions_when_there_are_strong_transition-transversion_and_GC-content_biases/links/0c96053520bf86ce49000000/Estimation-of-the-number-of-nucleotide-substitutions-when-there-are-strong-transition-transversion-and-G-C-content-biases.pdf

VARGHESE, N. J. *et al.* Microbial species delineation using whole genome sequences. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 14, p. 6761-6771, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv657>

WILLEMS, A. *et al.* Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 1, p. 111-117, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-111>

SUPPLEMENTS

SUPPLEMENT A - Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-502 (continue).

UFLA 03-502_genoma	GCF_900696085.1_ERZ807199_gen	GCF_018129525.1_ASM1812952v1	GCF_013114835.1_ASM1311483v1	GCF_013114825.1_ASM1311482v1	GCF_900094605.1_IMG-taxon_2617	GCF_016031635.1_ASM1603163v1	GCF_021044685.1_ASM2104468v1	GCF_018130765.1_ASM1813076v1	GCF_015291705.1_ASM1529170v1	GCF_019402665.1_ASM1940266v1	GCF_014529705.1_ASM1452970v1	GCF_016031655.1_ASM1603165v1	GCF_016031625.1_ASM1603162v1	GCF_900094575.1_IMG-taxon_2617	
100	87	81	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	UFLA 03-502_genoma
87	100	81	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	GCF_900696085.1_ERZ807199_gen
81	81	100	80	80	81	81	81	81	81	80	82	81	81	81	GCF_018129525.1_ASM1812952v1
82	82	80	100	88	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	GCF_013114835.1_ASM1311483v1
82	82	80	88	100	81	81	81	81	81	80	80	81	81	81	GCF_013114825.1_ASM1311482v1
82	82	81	81	81	100	88	88	88	88	87	86	88	88	88	GCF_900094605.1_IMG-taxon_2617
82	82	81	81	81	88	100	88	88	88	87	86	89	89	89	GCF_016031635.1_ASM1603163v1
82	82	81	81	81	88	88	100	88	87	87	86	88	88	88	GCF_021044685.1_ASM2104468v1
82	82	81	81	81	88	88	88	100	89	87	87	88	88	88	GCF_018130765.1_ASM1813076v1
82	82	81	81	81	88	88	87	89	100	87	87	87	88	87	GCF_015291705.1_ASM1529170v1
82	82	80	81	80	87	87	87	87	87	100	86	86	86	86	GCF_019402665.1_ASM1940266v1
82	82	82	81	80	86	86	86	87	87	86	100	86	86	86	GCF_014529705.1_ASM1452970v1
82	82	81	81	81	88	89	88	88	87	86	86	100	94	93	GCF_016031655.1_ASM1603165v1
82	82	81	81	81	88	89	88	88	88	86	86	94	100	93	GCF_016031625.1_ASM1603162v1
82	82	81	81	81	88	89	88	88	87	86	86	93	93	100	GCF_900094575.1_IMG-taxon_2617

Source: Author (2023)

SUPPLEMENT A - Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-502 (conclusion).

	GCF_020329485.1_Bradyrhizobium ce	GCF_020329435.1_Bradyrhizobium ln	GCF_018736105.1_Bradyrhizobium se	GCF_013178945.1_Bradyrhizobium a-	GCF_000344805.1_Bradyrhizobium a-	GCF_024809475.1_Bradyrhizobium o-	GCF_004022285.3_Bradyrhizobium ce	GCF_000284275.1_Bradyrhizobium YL	UFLA_03-502 genome	GCF_020329495.1_Bradyrhizobium a-	GCF_011516645.4_Bradyrhizobium a-	GCF_020889705.1_Bradyrhizobium se	GCF_017493175.3_Bradyrhizobium a-	GCF_020889785.1_Bradyrhizobium o-	GCF_020889685.1_Bradyrhizobium o-
GCF_020329485.1_Bradyrhizobium	100	82	82	81	80	81	81	81	82	83	83	82	83	82	82
GCF_020329435.1_Bradyrhizobium	82	100	82	80	80	81	81	81	82	82	82	82	82	82	82
GCF_018736105.1_Bradyrhizobium	82	82	100	81	81	81	81	81	82	82	82	82	82	82	82
GCF_013178945.1_Bradyrhizobium	81	80	81	100	87	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
GCF_000344805.1_Bradyrhizobium	80	80	81	87	100	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
GCF_024809475.1_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	100	88	87	82	82	82	82	82	82	82
GCF_004022285.3_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	87	87	100	82	82	82	82	82	82	82
GCF_000284275.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	100	90	89	90	91	90	90
UFLA_03-502 genome	83	82	82	81	81	82	82	82	90	100	90	90	90	90	90
GCF_020329495.1_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	89	90	100	90	91	89	90
GCF_011516645.4_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	90	90	90	100	95	90	92
GCF_020889705.1_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	91	90	91	95	100	90	91
GCF_017493175.3_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	90	90	89	90	90	100	95
GCF_020889785.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	90	90	90	92	91	95	100
GCF_020889685.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	90	90	90	92	91	95	100

Source: Author (2023)

SUPPLEMENT B - Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-584 (continue).

	GCF_900696085.1_ERZ807199_genu.	GCF_018129525.1_ASM1812952v1	GCF_013114835.1_ASM1311483v1	GCF_013114825.1_ASM1311482v1	GCF_900094605.1_IMG-taxon_2617z	GCF_016031635.1_ASM1603163v1	GCF_021044685.1_ASM2104468v1	GCF_018130765.1_ASM1813076v1	GCF_015291705.1_ASM1529170v1	GCF_019402665.1_ASM1940266v1	UFLA 03-584	GCF_014529705.1_ASM1452970v1	GCF_016031655.1_ASM1603165v1	GCF_016031625.1_ASM1603162v1	GCF_900094575.1_IMG-taxon_2617z	
100	81	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	GCF_900696085.1_ERZ807199_ger
81	100	80	80	81	81	81	81	81	80	81	82	81	81	81		GCF_018129525.1_ASM1812952v1
82	80	100	88	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81		GCF_013114835.1_ASM1311483v1
82	80	88	100	81	81	81	81	81	80	80	80	81	81	81		GCF_013114825.1_ASM1311482v1
82	81	81	81	100	88	88	88	88	87	87	86	88	88	88		GCF_900094605.1_IMG-taxon_2617
82	81	81	81	88	100	88	88	88	87	86	86	89	89	89		GCF_016031635.1_ASM1603163v1
82	81	81	81	88	88	100	88	87	87	86	86	88	88	88		GCF_021044685.1_ASM2104468v1
82	81	81	81	88	88	88	100	89	87	87	87	88	88	88		GCF_018130765.1_ASM1813076v1
82	81	81	81	88	88	87	89	100	87	87	87	87	88	87		GCF_015291705.1_ASM1529170v1
82	80	81	80	87	87	87	87	87	100	86	86	86	86	86		GCF_019402665.1_ASM1940266v1
82	81	81	80	87	86	86	87	87	86	100	88	86	86	86		UFLA 03-584
82	82	81	80	86	86	86	87	87	86	88	100	86	86	86		GCF_014529705.1_ASM1452970v1
82	81	81	81	88	89	88	88	87	86	86	86	100	94	93		GCF_016031655.1_ASM1603165v1
82	81	81	81	88	89	88	88	88	86	86	86	94	100	93		GCF_016031625.1_ASM1603162v1
82	81	81	81	88	89	88	88	87	86	86	86	93	93	100		GCF_900094575.1_IMG-taxon_2617z

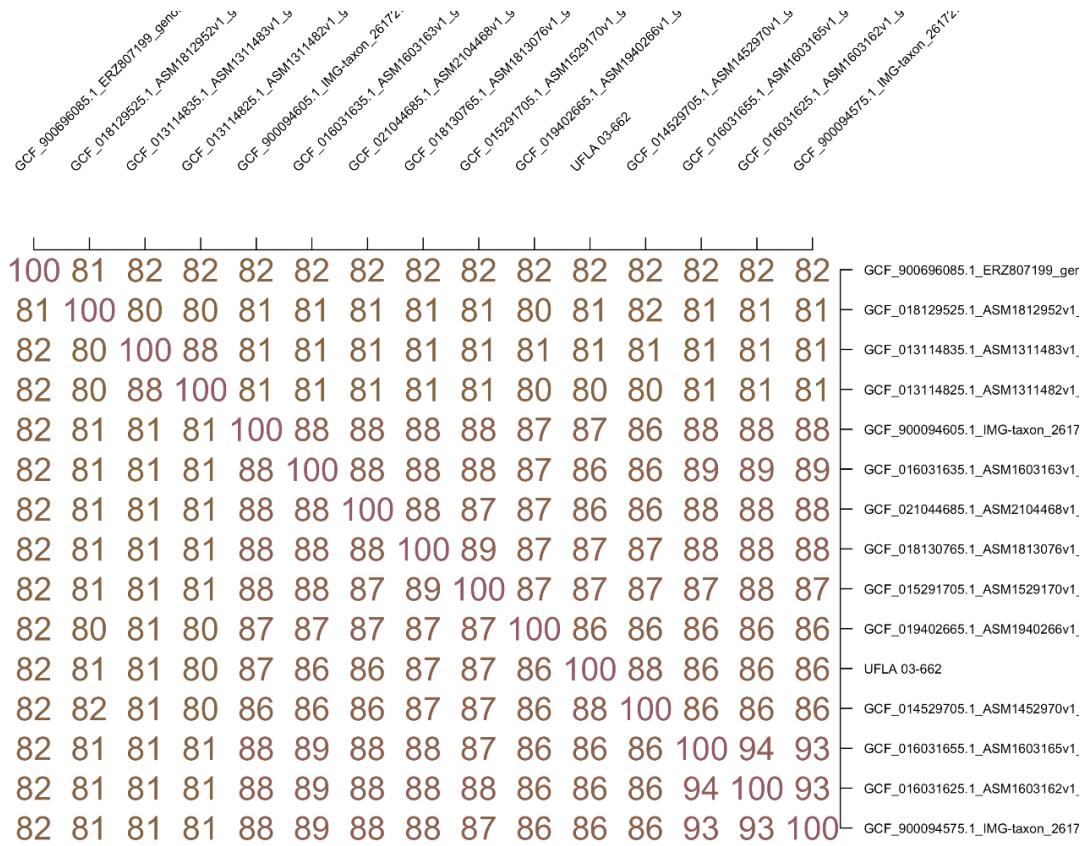
Source: Author (2023)

SUPPLEMENT B - Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-584 (conclusion).

	GCF_020329485.1_Bradyrhizobium ca	GCF_020329435.1_Bradyrhizobium l	GCF_018736105.1_Bradyrhizobium i	GCF_013178945.1_Bradyrhizobium s	GCF_000344805.1_Bradyrhizobium a	UFLA 03-584	GCF_000284275.1_Bradyrhizobium c	GCF_024809475.1_Bradyrhizobium c	GCF_004022285.3_Bradyrhizobium c	GCF_020329495.1_Bradyrhizobium y	GCF_011516645.4_Bradyrhizobium a	GCF_020889705.1_Bradyrhizobium s	GCF_017493175.3_Bradyrhizobium a	GCF_020889785.1_Bradyrhizobium q	GCF_020889685.1_Bradyrhizobium a
GCF_020329485.1_Bradyrhizobium	100	82	82	81	80	81	81	81	81	83	83	82	83	82	82
GCF_020329435.1_Bradyrhizobium	82	100	82	80	80	80	81	81	81	82	82	82	82	82	82
GCF_018736105.1_Bradyrhizobium	82	82	100	81	81	81	81	81	81	82	82	82	82	82	82
GCF_013178945.1_Bradyrhizobium	81	80	81	100	87	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
GCF_000344805.1_Bradyrhizobium	80	80	81	87	100	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
UFLA 03-584	81	80	81	81	81	100	87	86	86	82	82	82	82	82	82
GCF_000284275.1_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	87	100	87	87	82	82	82	82	82	82
GCF_024809475.1_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	86	87	100	88	82	82	82	82	82	82
GCF_004022285.3_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	86	87	88	100	82	82	82	82	82	82
GCF_020329495.1_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	82	100	90	90	90	90	90
GCF_011516645.4_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	82	90	100	90	91	89	90
GCF_020889705.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	82	90	90	100	95	90	92
GCF_017493175.3_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	82	90	91	95	100	90	91
GCF_020889785.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	82	90	89	90	90	100	95
GCF_020889685.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	82	90	90	92	91	95	100

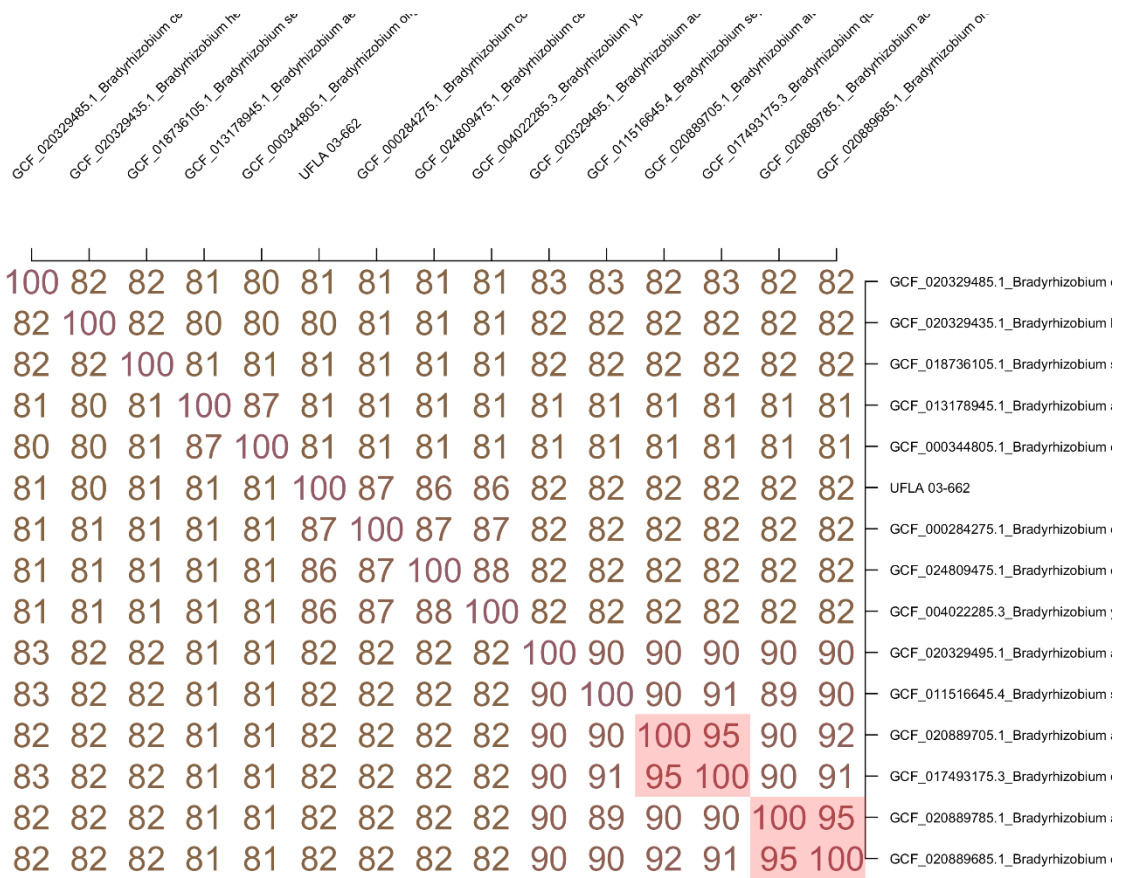
Source: Author (2023)

SUPPLEMENT C- Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-662 (continue).



Source: Author (2023)

SUPPLEMENT C - Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-662 (conclusion).



Source: Author (2023)

SUPPLEMENT D - Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-672 (continue).

	GCF_900696085.1_ERZ807199_geno.	GCF_018129525.1_ASM1812952v1	GCF_013114835.1_ASM1311483v1	GCF_013114825.1_ASM1311482v1	GCF_900094605.1_IMG-taxon_2617z	GCF_016031635.1_ASM1603163v1	GCF_021044685.1_ASM2104468v1	GCF_018130765.1_ASM1813076v1	UFLA 03-672	GCF_019402665.1_ASM1940266v1	GCF_014529705.1_ASM1452970v1	GCF_016031655.1_ASM1603165v1	GCF_016031625.1_ASM1603162v1	GCF_900094575.1_IMG-taxon_2617z
100	81	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82
81	100	80	80	81	81	81	81	81	81	80	82	81	81	81
82	80	100	88	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
82	80	88	100	81	81	81	81	81	81	80	80	81	81	81
82	81	81	81	100	88	88	88	88	88	87	86	88	88	88
82	81	81	81	88	100	88	88	88	88	87	86	89	89	89
82	81	81	81	88	88	100	88	87	87	87	86	88	88	88
82	81	81	81	88	88	88	100	89	88	87	87	88	88	88
82	81	81	81	88	88	87	89	100	88	87	87	87	88	87
82	81	81	81	88	88	87	88	88	100	88	87	87	87	87
82	80	81	80	87	87	87	87	87	88	100	86	86	86	86
82	82	81	80	86	86	86	87	87	87	86	100	86	86	86
82	81	81	81	88	89	88	88	87	87	86	86	100	94	93
82	81	81	81	88	89	88	88	88	87	86	86	94	100	93
82	81	81	81	88	89	88	88	87	87	86	86	93	93	100

Source: Author (2023)

SUPPLEMENT D - Average nucleotide identity (ANI) determined between the genome of the type strains of the *Bradyrhizobium* species and the strain UFLA 03-672 (conclusion).

	GCF_020329485.1_Bradyrhizobium cx	GCF_020329435.1_Bradyrhizobium lx	GCF_018736105.1_Bradyrhizobium lx	GCF_013178945.1_Bradyrhizobium lx	GCF_000344805.1_Bradyrhizobium lx	GCF_024809475.1_Bradyrhizobium ox	GCF_004022285.3_Bradyrhizobium cx	UFLA 03-672	GCF_000284275.1_Bradyrhizobium cx	GCF_020329495.1_Bradyrhizobium cx	GCF_011516645.4_Bradyrhizobium ax	GCF_020889705.1_Bradyrhizobium sx	GCF_017493175.3_Bradyrhizobium qx	GCF_020889785.1_Bradyrhizobium ax	GCF_020889685.1_Bradyrhizobium ox
GCF_020329485.1_Bradyrhizobium	100	82	82	81	80	81	81	81	81	83	83	82	83	82	82
GCF_020329435.1_Bradyrhizobium	82	100	82	80	80	81	81	81	81	82	82	82	82	82	82
GCF_018736105.1_Bradyrhizobium	82	82	100	81	81	81	81	81	81	82	82	82	82	82	82
GCF_013178945.1_Bradyrhizobium	81	80	81	100	87	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
GCF_000344805.1_Bradyrhizobium	80	80	81	87	100	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
GCF_024809475.1_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	100	88	88	87	82	82	82	82	82	82
GCF_004022285.3_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	88	100	87	87	82	82	82	82	82	82
UFLA 03-672	81	81	81	81	81	88	87	100	88	82	82	82	82	82	82
GCF_000284275.1_Bradyrhizobium	81	81	81	81	81	87	87	88	100	82	82	82	82	82	82
GCF_020329495.1_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	82	100	90	90	90	90	90
GCF_011516645.4_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	82	90	100	90	91	89	90
GCF_020889705.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	82	90	90	100	95	90	92
GCF_017493175.3_Bradyrhizobium	83	82	82	81	81	82	82	82	82	90	91	95	100	90	91
GCF_020889785.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	82	90	89	90	90	100	95
GCF_020889685.1_Bradyrhizobium	82	82	82	81	81	82	82	82	82	90	90	92	91	95	100

Source: Author (2023)

Artigo 2 – Eficiência simbiótica em *Mimosa bimucronata* e caracterização genética de estirpes de *Paraburkholderia* originárias de solos do Quadrilátero Ferrífero

Jordana Luísa de Castro¹, Daniele Cabral Michel¹, Priscila Isabela Rabelo¹, Rafael Almeida Leite¹, Fatima Maria de Sousa Moreira^{1*}

¹Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Campus UFLA, 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente: Tel.: +55 35 3829 1254; fax: +55 35 3829 1251. E-mail: fmoreira@ufla.br (F.M. de Souza Moreira).

Resumo: O Quadrilátero Ferrífero está localizado em Minas Gerais e tem como principal atividade a mineração. Devido aos impactos causados no solo e na vegetação, conhecer os processos que ocorrem nestes ambientes e o papel dos microorganismos envolvidos, torna-se muito importante na busca por manejos mais adequados, utilizando plantas e bactérias já adaptadas às condições edáficas destes locais. O objetivo deste trabalho foi avaliar estirpes de *Paraburkholderia* originárias de solos do Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais, quanto à sua eficiência em promover o crescimento e nodular *Mimosa bimucronata*; verificar o posicionamento das estirpes em estudo em relação às estirpes tipo já descritas com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA; e o sequenciamento do DNA genômico de estirpes representativas de grupos obtidos por sequências parciais do gene 16S rRNA, além de verificar a presença de possíveis novas espécies dentre as estirpes analisadas. Foram testadas 46 estirpes, isoladas de solos sob diferentes fitofisionomias quanto à sua eficiência em promover o crescimento e nodular plantas da espécie arbórea *Mimosa bimucronata* em condições axênicas, e, além disso, a eficiência da fixação biológica também foi avaliada através da medição do teor de clorofila presente nas folhas, utilizando o medidor de clorofila SPAD e análise do teor de N foliar utilizando o método semi-micro Kjeldahl. Dentre as estirpes testadas, a maioria foi capaz de promover a nodulação de *Mimosa bimucronata*, como a estirpe UFLA 03-690, que se destacou nos parâmetros matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e SPAD. A partir das sequências do gene 16S rRNA destas estirpes, foi construída uma árvore filogenética que permitiu observar o posicionamento das estirpes estudadas em relação às 115 estirpes tipo já descritas do gênero. Também foi realizado o sequenciamento do DNA genômico de 4 destas

estirpes: UFLA 03-476, UFLA 03-477, UFLA 03-600 e UFLA 03-699. Com base nas sequências obtidas do genoma destas estirpes foi realizada a Average Nucleotide Identity (ANI) e as estirpes apresentaram similaridade de 98% com a espécie *Paraburkholderia nodosa*. Os resultados encontrados mostram que as estirpes isoladas dos solos do Quadrilátero Ferrífero, em especial a UFLA 03-690, são capazes de promover o crescimento de *Mimosa bimucronata*.

Palavras-chave: *Mimosa bimucronata* fixação biológica de nitrogênio *Paraburkholderia*.

1 Introdução

As bactérias pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* são bastonetes gram-negativos retos ou levemente curvos, com um ou mais flagelos polares. Podem ser encontradas nos mais variados ambientes, incluindo o solo, a água e em associações com plantas (incluindo nódulos de leguminosas e a rizosfera). Este gênero foi proposto recentemente com base em estudos de taxonomia, para reclassificar algumas espécies antes incluídas dentro do gênero *Burkholderia*, além do fato de que, apesar de compartilharem características semelhantes a este gênero, as *Paraburkholderias* tem como principal habitat os ecossistemas, diferente das *Burkholderias* que incluem cepas patogênicas, responsáveis por causar doenças respiratórias e infecções graves em seres humanos (SAWANA et al., 2014; TAPIA-GARCIA et al., 2020; VIO et al., 2020).

Atualmente são descritas cerca de 115 espécies de *Paraburkholderia* (PARTE et al., 2020). A capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais pode estar relacionada ao tamanho do genoma de um gênero, ou seja, se o material genômico for grande isso contribui para o sucesso ecológico já que ele pode ser capaz de abrigar uma ampla gama de características fisiológicas (MITTER et al., 2013). Pratama et al. (2017), sugerem que a capacidade de adaptação a diferentes condições edáficas do gênero *Paraburkholderia*, se deve à sua diversidade fenotípica.

As bactérias pertencentes a este gênero, podem atuar na promoção do crescimento vegetal, através de mecanismos como a liberação de compostos na rizosfera que são absorvidos pela planta e auxiliam na sua nutrição (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014). Estes mecanismos incluem a nutrição de fósforo para as plantas e produção de sideróforos (SOUZA et al., 2020), produção de exopolissacarídeos (FERREIRA et al., 2009), fixação de nitrogênio (CHEN et al., 2005), produção de hormônios de crescimento, ação contra patógenos e doenças, produção de antibióticos (GLICK, 2012), dentre outros.

Dentre as leguminosas capazes de estabelecer relação simbiótica com estas bactérias, o gênero *Mimosa* se destaca por possuir afinidade simbiótica por β -proteobactérias (CHEN et al., 2003). Devido à esta característica, alguns trabalhos têm se concentrado em estudar a relação entre o gênero *Mimosa* e estirpes dos gêneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Trinickia* (BONTEMPS et al., 2010; CHEN et al., 2008; MISHRA et al., 2012; SHEU et al., 2012; 2013). Os resultados obtidos por Bontemps et al. (2010), mostram que nos biomas Cerrado e Caatinga, a nodulação de *Mimosa* spp., está associada a bactérias do gênero *Paraburkholderia*. Já o

trabalho de Soares Neto et al. (2022) observou que tanto em solos ultramáficos como em não ultramáficos, as espécies *Mimosa somnians* e *Mimosa clausenii*, são preferencialmente noduladas por estirpes de *Paraburkholderia*.

Alguns trabalhos sugerem que as condições edafoclimáticas influenciam de modo significativo a ocorrência deste gênero, já que predominam em solos mais ácidos (BONTEMPS et al., 2010; CASTRO et al., 2017; DIAS et al. 2021; REIS JR et al., 2010).

Castro et al. (2017) encontraram que *Paraburkholderia* foi o gênero mais frequente entre estirpes de rizóbio simbióticas capturadas por *Vigna unguiculata* em solos sob Canga (pH 4,7) e Cerrado (pH 5,0), mas não em Mata Atlântica (pH 4,2), e áreas mineradas recuperadas com gramíneas (pH 5,6), indicando que embora o pH ácido favoreça *Paraburkholderia* em algumas fitofisionomias, outros fatores afetam sua ocorrência em ecossistemas mais complexos como a Mata Atlântica. Atualmente são descritas cerca de 127 espécies de *Paraburkholderia*. Estirpes pertencentes a este gênero são isoladas de amostras ambientais como água e solo, na rizosfera de plantas e fixando nitrogênio como *P. lycopersici*, isolada da rizoesfera de tomateiro (TAPIA et al., 2020), *P. podalyriae*, isolada de nódulos de nódulos de *Podalya calytrata* (MAVIMA et al., 2022), *P. symbiotica* isolada de nódulos de *Mimosa cordistipula* (SHEW et al., 2012), *P. youngii*, *P. atlântica* e *P. franconis*, isoladas de nódulos de *Mimosa pudica* (MAVIMA et al., 2021; PAULITSCH et al., 2020).

A espécie *Mimosa bimucronata* foi escolhida neste estudo pois exerce papel importante nos ecossistemas em processos de restauração da vegetação e ser encontrada em ambientes e por estabelecer simbiose com *Paraburkholderia*. Essa associação pode ser explicada de acordo com as características do solo (pH, níveis de nutrientes, salinidade e metais pesados). Dentre as espécies de *Paraburkholderia* capazes de estabelecer simbiose e nodular *Mimosa bimucronata* estão *P. nodosa* e *P. phymatum* (CHEN et al., 2007; ELLIOTT et al., 2007).

Considerando o potencial biotecnológico de estirpes de *Paraburkholderia* e a importância da utilização de plantas como *Mimosa bimucronata* em áreas em processo de recuperação, este estudo teve como objetivo identificar geneticamente através da análise do gene 16S rRNA e sequenciamento do DNA genômico e verificar a eficiência simbiótica de estirpes de *Paraburkholderia* isoladas por Castro et al. (2017) de diferentes fitofisionomias do Quadrilátero ferrífero em *Mimosa bimucronata*.

2 Material e Métodos

Origem das estirpes

As 46 estirpes testadas neste trabalho são oriundas de solos sob influência de mineração, pertencentes à Mineradora Vale S/A. Foram coletadas amostras de solo nos municípios de Nova Lima, no Centro Tecnológico de Ferrosos – Miguelão e em Brumadinho, na Mina Córrego do Feijão, em quatro fitofisionomias distintas: Campo Rupestre (Canga), Cerrado, Mata Atlântica e uma área revegetada com gramíneas. Após a coleta, foi implantado um experimento em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da UFLA.

A captura das estirpes utilizadas no presente estudo foi realizada no trabalho de Castro et al. (2017), utilizando o feijão caupi (*Vigna Unguiculata* (L.) Walp) como planta isca, cultivado condições axênicas.

Eficiência das estirpes de *Paraburkholderia* sp. em nodular e promover o crescimento vegetal em *Mimosa bimucronata*

As 46 estirpes de *Paraburkholderia* sp. foram avaliadas quanto à sua eficiência em estabelecer simbiose e promover o crescimento vegetal de *Mimosa bimucronata*. Para isso, foram conduzidos dois experimentos entre os meses de dezembro de 2020 e maio de 2021, na casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo – DCS, da Universidade Federal de Lavras. Para a obtenção do inóculo, as estirpes foram crescidas em meio de cultura 79 sólido (FRED & WAKSMAN, 1928), até o aparecimento de colônias isoladas (entre 1 e 3 dias), em seguida foram crescidas em meio de cultura 79 líquido e incubadas com agitação de 150 rpm de acordo com seu tempo de crescimento, sob temperatura de 28°C.

Para a implantação dos experimentos, as sementes foram desinfestadas superficialmente utilizando-se álcool etílico a 92,8% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 2% (2 minutos) e submetidas a lavagens sucessivas em água destilada estéril. Em seguida, foram submetidas ao tratamento para superação da dormência através de imersão em água quente fora do aquecimento, à temperatura de 80° C (FOWLER; CARPANEZZI, 1998), permanecendo em repouso por 18 horas na mesma água para embebição. Após esta etapa, foi realizada a semeadura em sementeiras e a repicagem realizada duas semanas depois da germinação, para tubetes com volume de 820 cm³ previamente esterilizados, contendo areia e vermiculita na proporção de 1:1.

As estirpes foram testadas em dois experimentos, o experimento 1 com 18 estirpes e o experimento 2 com 28 estirpes. Estas estirpes são originárias de 4 fitofisionomias distintas. As estirpes UFLA 03-679, UFLA 03-474, UFLA 03-506, UFLA 03-477, UFLA 03-476, UFLA 03-473, UFLA 03-698, UFLA 03-467, UFLA 03-507, UFLA 03-593, UFLA 03-465, UFLA 03-493, UFLA 03-454, UFLA 03-471, UFLA 03-497, UFLA 03-491, UFLA 03-470, UFLA 03-690, UFLA03-687, UFLA 03-699, UFLA 03-461, UFLA 03-464 e UFLA 03-485 foram obtidas de solo sob vegetação de Cerrado. As estirpes UFLA 03-522, UFLA 03-531, UFLA 03-566, UFLA 03-571, UFLA 03-577, UFLA 03-525, UFLA 03-528, UFLA 03-532, UFLA 03-573 e UFLA 03-513 obtidas de solo da área revegetada com gramíneas. A estirpe UFLA 03-612 foi obtida a partir de solo sob Floresta. As estirpes UFLA 03-608, UFLA 03-595, UFLA 03-602, UFLA 03-603, UFLA 03-606, UFLA 03-599, UFLA 03-598, UFLA 03-600, UFLA 03-605, UFLA 03-601, UFLA 03-597 e UFLA 03-604 foram obtidas de solo sob Campo Rupestre (Canga). Todas estavam sendo conservadas na coleção do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos da UFLA por diferentes métodos: liofilização, deep-freezer a -80°C , água e cultura em meio 79.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, e cada uma das estirpes representou 1 tratamento. Nestes tratamentos, foi inoculado 1 mL de inoculante de cada estirpe nas plantas de *Mimosa bimucronata* após duas semanas da repicagem das mudas para os tubetes. Estes tratamentos foram irrigados com solução de Hoagland com baixa concentração de N ($5,25\text{ mg N L}^{-1}$). Além dos tratamentos com as estirpes em estudo, foram adicionados tratamentos controle sem inoculação de estirpes, sendo um irrigado com solução com baixa concentração de N ($5,25\text{ mg N L}^{-1}$) e outro com alta concentração de N ($52,5\text{ mg N L}^{-1}$). Também foi adicionado um controle positivo irrigado com solução com baixa concentração de N ($5,25\text{ mg N L}^{-1}$) inoculado com a estirpe UFLA 01-750, que se mostrou eficiente em *Mimosa foliolosa* em estudo anterior (ARAÚJO et al., 2017).

A composição da solução nos tratamentos inoculados com as estirpes e no controle sem inoculação com baixa concentração de N ($5,25\text{ mg N L}^{-1}$) de soluções estoque em mL por 4 L de água foi de: 0,4 de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1M ($236,16\text{ g L}^{-1}$); 0,1 de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1M ($115,03\text{ g L}^{-1}$); 0,6 de KNO_3 1M ($101,11\text{ g L}^{-1}$); 2,0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M ($246,9\text{ g L}^{-1}$); 3,0 de K_2SO_4 0,5M ($87,13\text{ g L}^{-1}$); 10 de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05M ($12,6\text{ g L}^{-1}$); 200 de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01M ($1,72\text{ g L}^{-1}$); 1 de FeCl_3 0,06M (10 g L^{-1}) e 1 de micronutrientes (H_3BO_3 $2,86\text{ mg L}^{-1}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $2,03\text{ mg L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,22\text{ mg L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,08\text{ mg L}^{-1}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,09\text{ mg L}^{-1}$).

A composição da solução no tratamento controle sem inoculação com alta concentração de N mineral ($52,5\text{ mg L}^{-1}$) de soluções estoque em mL por 4 L de água, foi de: 4,0 de

Ca(NO₃)₂.4H₂O 1M (236,16 g L⁻¹); 1 de NH₄H₂PO₄ 1M (115,03 g L⁻¹); 6 de K₂SO₄ 0,5M (87,13 g L⁻¹); 2,0 de MgSO₄.7H₂O 1M (246,9 g L⁻¹); 1 de FeCl₃ 0,06M (10 g L⁻¹) e 1 de micronutrientes (H₃BO₃ 2,86 mg L⁻¹; MnSO₄.4H₂O 2,03 mg L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O 0,22 mg L⁻¹; CuSO₄.5H₂O 0,08 mg L⁻¹ e Na₂MoO₄.H₂O 0,09 mg L⁻¹). As soluções nutritivas foram preparadas e armazenadas em garrafas âmbar de 1 litro e posteriormente autoclavadas por 60 minutos, à pressão de 1,5 kg cm², a 121°C.

Os dois experimentos foram conduzidos por um período de 4 meses e após 3 meses do plantio, a eficiência simbiótica das estirpes testadas foi avaliada através do índice SPAD (Soil Plant Analysis Development), que é utilizado como uma medida indireta do teor de clorofila nas plantas. Foram realizadas medições nas folhas do terço médio e superior das plantas, de acordo com as instruções do fabricante do aparelho.

As plantas foram coletadas após 4 meses e determinados os seguintes parâmetros: número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA). Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011). Os dados de NN e MSN foram transformados para a raiz quadrada de (y+1,0). Os efeitos dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (SCOTT & KNOTT, 1974).

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

As sequências do gene 16S rRNA obtidas por Castro et al. (2017), foram comparadas com as sequências das estirpes tipo já depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn, em abril de 2022 para confirmação da identificação ao nível de gênero e usadas para construção da árvore filogenética.

Para a construção da árvore, as sequências do gene 16S rRNA das espécies tipo de *Paraburkholderia* foram obtidas no Genbank (NCBI). Em seguida, as sequências foram alinhadas e editadas com o pacote de software MEGA7 (KUMAR et al. 2016). A árvore filogenética, foi construída utilizando o método estatístico Maximum likelihood (ML), com bootstrap baseado em 1000 repetições. O modelo de distância usado para a árvore 1 (380 pb) foi o modelo Kimura 2 parâmetros, já para a árvore 2 (1101 pb) o modelo utilizado foi Tamura-Nei, para esta árvore as sequências das estirpes UFLA 03-493, UFLA 03-687, UFLA 03-604, UFLA 03-506, UFLA 03-566, UFLA 03-597 e UFLA 03-690 foram retiradas devido ao tamanho reduzido de pares de bases que estas sequências apresentavam.

Sequenciamento do genoma

O sequenciamento do genoma foi realizado para as estirpes UFLA 03-476, UFLA 03-477 e UFLA 03-699 isoladas a partir de solo da área de Cerrado e para a estirpe UFLA 03-600 isolada de solo sob Canga. Estas estirpes foram cultivadas em meio 79 líquido, de acordo com seu tempo de crescimento (1-3 dias). Após este período, foi retirada uma alíquota de 1 mL do meio de cultura de cada estirpe e estes foram transferidos para microtubos. Em seguida, a extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de extração de DNA do kit Wizard® Genomic DNA Purification.

Após o sequenciamento do genoma, foram realizadas análises dos resultados na plataforma Kbase (<https://www.kbase.us/>). A montagem do genoma foi realizada usando o SPADes 3.13.0 (BANKEVICH et al. 2012) e a qualidade e integridade dos genomas foram verificadas com CheckM 1.0.18 (PARKS et al. 2015).

Identidade média de nucleotídeos (ANI)

Após o sequenciamento do DNA gênomico e montagem do genoma, foi calculada a identidade média de nucleotídeos (ANI). Para isso, foi utilizada a plataforma Enveomics (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix/>), por meio da ferramenta Matriz ANI/AAI, onde a calculadora de matriz estima a relação genética entre as estirpes testadas e as estirpes tipo (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2016).

3 Resultados e discussão

Eficiência das estirpes de *Paraburkholderia* em nodular e promover o crescimento vegetal em *Mimosa bimucronata*

Para ambos os experimentos, após o período de implantação, verificou-se que as plantas dos controles sem inoculação de estirpes, com baixa e alta concentração de nitrogênio não apresentavam nódulos em suas raízes, indicando que não houve contaminação. O controle positivo inoculado com a estirpe UFLA 01-750, apresentou nodulação e as plantas de *Mimosa bimucronata* se desenvolveram normalmente, indicando que os experimentos foram conduzidos de maneira correta para o estabelecimento e funcionamento da simbiose. Os dados referentes à eficiência são apresentados nas tabelas 1 (Experimento 1) e 2 (Experimento 2), para cada experimento.

Tabela 1 - Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca de raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), índice SPAD e teor de N de plantas de *Mimosa bimucronata* inoculadas com estirpes de *Paraburkholderia*, Experimento 1, conduzido de dezembro de 2020 a abril de 2021 (continua).

Tratamentos	NN	MSN	MSR	MSPA	Índice SPAD	N total
	mg por planta		g por planta			
UFLA 03-679	650,66c	84,33a	0,449b	0,750b	21,7a	1,86 b
UFLA 03-474	513a	65a	0,273b	0,461c	15,23a	1,40 b
UFLA 03-522	0c	0b	0,494b	0,395c	26,73a	1,47 b
UFLA 03-506	608a	91a	0,356b	0,791b	21,93a	2,38 a
UFLA 03-477	570a	85,33a	0,477b	0,870b	23,96a	2,43 a
UFLA 03-531	18c	16,66b	0,446b	0,451c	21,4a	1,66 b
UFLA 03-566	3c	3,32b	0,481b	0,456c	27,03a	1,63 b
UFLA 03-612	1c	4,66b	0,536b	0,908b	19,73a	1,58 b
UFLA 03-608	485a	68,33a	0,377b	0,665b	22,56a	1,59 b
UFLA 03-571	0,33c	0,33b	0,530b	0,420c	25,43a	1,62 b
UFLA 03-476	366,66b	37,66a	0,483b	0,475c	18,26a	1,52 b
UFLA 03-473	390,33b	82,66a	0,294b	0,555c	19,16a	1,58 b
UFLA 03-577	0c	0b	0,545b	0,535c	23,96a	1,38 b
UFLA 03-595	13,33c	5,66b	0,566b	0,414c	23,3a	1,69 b
UFLA 01-750	18c	19b	0,551b	0,717b	24,16a	1,92 b
UFLA 03-698	229,33b	74,66a	0,383b	0,492c	22,7a	1,97 b
UFLA 03-525	0c	0b	0,523b	0,636b	21,66a	1,31 b
UFLA 03-528	13,66c	11b	0,384b	0,608b	22,96a	1,55 b
UFLA 03-532	0c	0b	0,408b	0,486c	19,83a	0,86 b
Baixa concentração de N	0c	0b	0,496b	0,343c	10,56a	1,28 b
Alta concentração de N	0c	0b	1,382 a	2,68a	26,3a	2,87 a
CV%	50,31	43,65	31,56	24,28	25,12	21,72

(Conclusão) As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023)

Conforme mostrado na tabela 1, as estirpes de *Paraburkholderia* foram capazes de nodular as plantas de *Mimosa bimucronata*, exceto UFLA 03-522, UFLA 03-577, UFLA 525 e UFLA 03-532, que são oriundas de solo da área revegetada com Capim. Em relação à matéria seca de nódulos, a maior produção foi obtida pelas estirpes UFLA 03-476, UFLA 03-474,

UFLA 03-698, UFLA 03-608, UFLA 03-477, UFLA 03-506, UFLA 03-473 e UFLA 03-679, sendo superiores ao controle positivo UFLA 01-750. Para a MSR, não houve diferença entre as estirpes testadas e o controle com baixa concentração de nitrogênio, sendo o maior valor apresentado pelo controle com alta concentração de nitrogênio.

Com relação à MSPA, o controle nitrogenado foi superior a todos os tratamentos, as estirpes UFLA 03-679, UFLA 03-506, UFLA 03-477, UFLA 03-612, UFLA 03-608, UFLA 03-525, UFLA 03-528 e UFLA 01-750 apresentaram valores intermediários e o restante das estirpes se agrupou junto ao tratamento com baixa concentração de nitrogênio. Os valores do índice SPAD não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 2 - Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca de raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), índice SPAD e teor de N de plantas de *Mimosa bimucronata* inoculadas com estirpes de *Paraburkholderia*. Experimento 2 conduzido de janeiro a maio de 2021.

Tratamentos	NN	MSN	MSR	MSPA	Índice SPAD	N total
	mg por planta		--g por planta--			
UFLA 03-602	123,66 b	45,66 b	0,452 c	0,546 d	22,36 c	2,90 c
UFLA 03-467	276,66 a	59,30 a	0,430 c	0,709 c	24,03 c	2,62 c
UFLA 03-507	170,00 a	38,00 b	0,517 c	0,563 d	24,66 c	2,54 c
UFLA 03-593	0 c	0 c	0,646 b	0,456 e	18,70 c	2,31 c
UFLA 03-465	389,66 a	51,00 b	0,400 c	0,529 d	23,20 c	3,10 c
UFLA 03-493	581,33 a	66,66 b	0,450 c	0,652 d	26,96 b	1,48 c
UFLA 03-454	516,33 a	53,00 b	0,337 d	0,446 e	24,10 c	2,10 c
UFLA 03-471	622,66 a	103,33 a	0,430 c	0,861 c	29,76 b	2,63 c
UFLA 03-573	5,33 c	07,66 c	0,615 b	0,452 e	20,26 c	2,03 c
UFLA 03-497	343,00 a	54,66 b	0,338 d	0,421 e	19,00 c	1,93 c
UFLA 03-491	408,33 a	47,00 b	0,322 d	0,617 d	23,23 c	2,35 c
UFLA 03-603	273,33 a	55,00 b	0,272 d	0,456 e	18,90 c	2,42 c
UFLA 03-606	0 c	0 c	0,698 b	0,472 e	21,63 c	2,45 c
UFLA 03-513	0 c	0 c	0,423 c	0,396 e	19,80 c	2,33 c
UFLA 03-470	575,33 a	118,66 a	0,523 c	1,034 b	28,23 b	2,85 c
UFLA 03-690	467,66 a	112,00 a	1,060 a	1,894 a	38,93 a	3,52 c
UFLA 03-687	0 c	0 c	0,442 c	0,368 e	14,96 c	2,00 c
UFLA 03-599	542,33 a	69,66 b	0,384 d	0,496 e	22,03 c	2,54 c
UFLA 03-598	8,00 c	10,00 c	0,506 c	0,439 e	14,80 c	2,00 c
UFLA 03-600	462,00 a	69,66 b	0,510 c	0,335 e	21,60 c	2,68 c
UFLA 03-699	203,00 b	43,66 b	0,473 c	0,433 e	22,60 c	2,48 c
UFLA 03-461	439,33 a	67,00 b	0,290 d	0,368 e	17,36 c	2,56 c
UFLA 03-463	8,00 c	06,33 c	0,460 c	0,322 e	20,16 c	2,76 c
UFLA 03-464	313,66 a	55 b	0,329 d	0,408 e	15,1 c	2,36 c
UFLA 03-601	427,66 a	47,66 b	0,32 d	0,584 d	29,3 c	2,59 c

UFLA 03-597	14,00 c	19,66 c	0,48 c	0,381 e	17,93 c	2,95 c
01-750	497,33 a	58,33 b	0,425 c	0,393 e	16,56 c	1,99 c
UFLA 03-604	0 c	0 c	0,53 c	0,353 e	18,26 c	2,41 c
UFLA 03-485	376,33 a	48 b	0,248 d	0,406 e	20,06 c	3,22 c
Com N	0 c	0 c	0,699 b	1,17 b	43,1 a	3,03c
Com baixo N	0 c	0 c	0,594 b	0,198 e	17 c	2,30 c
CV%	32,12	30,99	22,13	20,87	23,97	20,16

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2023)

No experimento 2, as estirpes UFLA 03-467, UFLA 03-507, UFLA 03-465, UFLA 03-493, UFLA 03-454, UFLA 03-471, UFLA 03-497, UFLA 03-491, UFLA 03-603, UFLA 03-470, UFLA 03-690, UFLA 03-599, UFLA 03-600, UFLA 03-461, UFLA 03-464, UFLA 03-601, UFLA 01-750 e UFLA 03-485 mostraram o maior número de nódulos (Tabela 2). As estirpes UFLA 03-602 e UFLA 03-699 apresentaram valores intermediários. Com relação à MSN, houve diferença significativa entre os tratamentos e as estirpes UFLA 03-467, UFLA 03-471, UFLA 03-470 e UFLA 03-690 apresentaram os maiores valores. Já para a MSR, também foi observada diferença entre os tratamentos e a estirpe UFLA 03-690 apresentou o maior valor para este parâmetro e as estirpes UFLA 03-593, UFLA 03-573, UFLA 03-606 apresentaram valores intermediários.

Com relação à MSPA, houve diferença entre os tratamentos e a estirpe UFLA 03-690 apresentou valor superior ao do controle com alta concentração de nitrogênio. As estirpes UFLA 03-470, UFLA 03-467, UFLA 03-471, UFLA 03-602, UFLA 03-507, UFLA 03-465, UFLA 03-493, UFLA 03-491 e UFLA 03-601 apresentaram valores intermediários.

Para os dados referentes ao índice SPAD, houve diferença entre os tratamentos, as plantas inoculadas com a estirpe UFLA 03-690 e o controle nitrogenado apresentaram os maiores valores, seguidos das plantas inoculadas com as estirpes UFLA 03-493, UFLA 03-471 e UFLA 03-470.

Os dados de eficiência obtidos no presente trabalho, corroboram com os estudos sobre a nodulação de estirpes de *Paraburkholderia* em *Mimosa*. As bactérias do gênero *Paraburkholderia* tem afinidade simbiótica especialmente com plantas de *Mimosa* spp. (PAULITSCH et al., 2021). Espécies de *Paraburkholderia* foram identificadas em simbiose com plantas de *Mimosa* spp. como *Paraburkholderia sabiae*, isolada de nódulos fixadores de nitrogênio em raízes de *Mimosa caesalpinifolia* (CHEN et al., 2008).

A estirpe UFLA 03-690 foi isolada de solo sob Cerrado e apresentou os melhores valores para os parâmetros analisados quando inoculada em *Mimosa bimucronata*. Reis Jr. et al., (2010)

analisaram a nodulação e a fixação biológica de N₂ de espécies de *Mimosa* nos biomas de Cerrado e Caatinga no Brasil e identificaram que estirpes de *Paraburkholderia* são predominantes e foram capazes de nodular plantas de *Mimosa esplêndida*, *Mimosa setosissima* e *Mimosa decorticans*.

Tendo em vista que os solos sob Cerrado apresentam como características a baixa fertilidade e níveis de acidez mais altos, estas bactérias parecem ser bem adaptadas à estas condições, o que justifica os estudos que buscam identificar as espécies presentes nestes locais (CASTRO et al., 2017; DALL'AGNOL et al., 2016).

As plantas de *Mimosa bimucronata* são leguminosas florestais, que ocorrem na Mata Atlântica brasileira e são capazes de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio e por isso, podem ser importantes na restauração ecológica de ambientes degradados (CANOSA et al., 2012). Alguns trabalhos identificaram a simbiose entre estirpes de *Paraburkholderia* e plantas de *Mimosa bimucronata*. O trabalho de Chen et al. (2005), identificou que a estirpe BR 3461 isolada da Amazônia foi capaz de formar nódulos de fixação de nitrogênio com esta planta.

O trabalho de Araújo et al. (2017) utilizou estirpes de *Paraburkholderia* spp. isoladas de *Mimosa tenuiflora* e *Macroptilium atropurpureum* e avaliaram sua eficiência simbiótica com *Mimosa bimucronata* em experimentos de casa de vegetação sob condições estéreis. Os resultados encontrados identificaram estirpes com potencial para utilização como inoculantes para *Mimosa bimucronata*.

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

A seqüência do gene 16S rRNA de 44 das 46 estirpes avaliadas neste estudo foi utilizada para a construção das árvores filogenéticas (Figuras 1 e 2). A tabela 3 refere-se aos grupos GI, GII e GIII (Figura1), contendo as espécies descritas de *Paraburkholderia* e não incluíram estirpes UFLA.

Inicialmente é possível observar que a estirpe UFLA03-532 mostrou uma história evolutiva muito semelhante as espécies *P.gramminae* e *P. cepacea*, pois formaram um grupo na filogenia apresentada. Estas se encontram dentro de um outro grupo contendo outras cinco estirpes: UFLA03-513UFLA03-522, UFLA 03-525, UFLA 03-531 e UFLA 03-571, oriundas da área revegetada com Capim. A estirpe UFLA 03-573 diferentemente da maioria das estirpes UFLA estudadas se posicionou isoladamente. Um outro grupo foi formado com estirpes oriundas da área de Cerrado, incluindo UFLA 03-679, UFLA 03-493, UFLA 03-698, UFLA 03-491, UFLA 03-477, UFLA 03-473 e UFLA 03-461 que evolutivamente são muito próximas

das espécies *P. hiikae* e *P. guartelaensis*. A estirpe UFLA 03-577 se posicionou junto às espécies *P. caribensis* e *P. terrae*.

Um outro agrupamento presente na árvore filogenética incluiu as estirpes UFLA 03-528 e UFLA 03-566 originárias de área revegetada com Capim, a estirpe UFLA 03-601, obtida a partir de solo sob Canga e a estirpe UFLA 03-612 oriunda de área de Floresta. Este resultado é bastante interessante visto que embora essas estirpes tenham sido isoladas de áreas diferentes, posicionaram-se agrupadas e foram isoladas da mesma planta hospedeira. A estirpe UFLA 03-690 ficou próxima de *P. ribeironis*, *P. panacihumi* e *P. ferriae*. Com relação à estirpe UFLA 03-506, está se distanciou das estirpes em estudo e das estirpes das espécies já descritas. Um outro clado formado, incluiu estirpes das áreas de Cerrado (UFLA 03-454, UFLA 03-463, UFLA 03-464, UFLA 03-465, UFLA 03-467, UFLA 03-470, UFLA 03-471, UFLA 03-474, UFLA 03-476, UFLA 03-485, UFLA 03-497, UFLA 03-595, UFLA 03-598, UFLA 03-599, UFLA 03-600, UFLA 03-602 e UFLA03-687) e da área de Canga (UFLA 03-603, UFLA 03-606, UFLA 03-608, UFLA 03-604 e UFLA 03-597).

A fim de maior resolução do posicionamento das estirpes UFLA estudadas junto das estirpes tipo das espécies já descritas de *Paraburkholderia*, uma nova árvore filogenética foi construída. Dessa forma, na figura 2, a árvore construída com sequencias maiores (1101 pb) mostra a relação entre as estirpes tipo descritas. A tabela 4 refere-se aos grupos GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, GVII e GVIII, contendo as espécies descritas de *Paraburkholderia* e não incluíram estirpes UFLA.

Devido ao fato das sequencias apresentarem um maior número de pares de bases, a distribuição de algumas estirpes ao longo da árvore foi alterada comparada à árvore anterior. Como na árvore da figura 1, novamente as estirpes de Cerrado e área revegetada com Capim formaram um grupo contendo as estirpes: UFLA 03-454, UFLA 03-463, UFLA 03-464, UFLA 03-465, UFLA 03-467, UFLA 03-470, UFLA 03-471, UFLA 03-474, UFLA03-476, UFLA 03-485, UFLA 03-497, UFLA 03-595, UFLA 03-598, UFLA 03-599, UFLA 03-600, UFLA 03-602, UFLA 03-603, UFLA 03-606 e UFLA 03-608 (Figura 2). Esse agrupamento mostra que, aparentemente, as estirpes apresentam similaridade entre suas sequências não em função de seus locais de origem, mas sim de suas respectivas plantas hospedeiras.

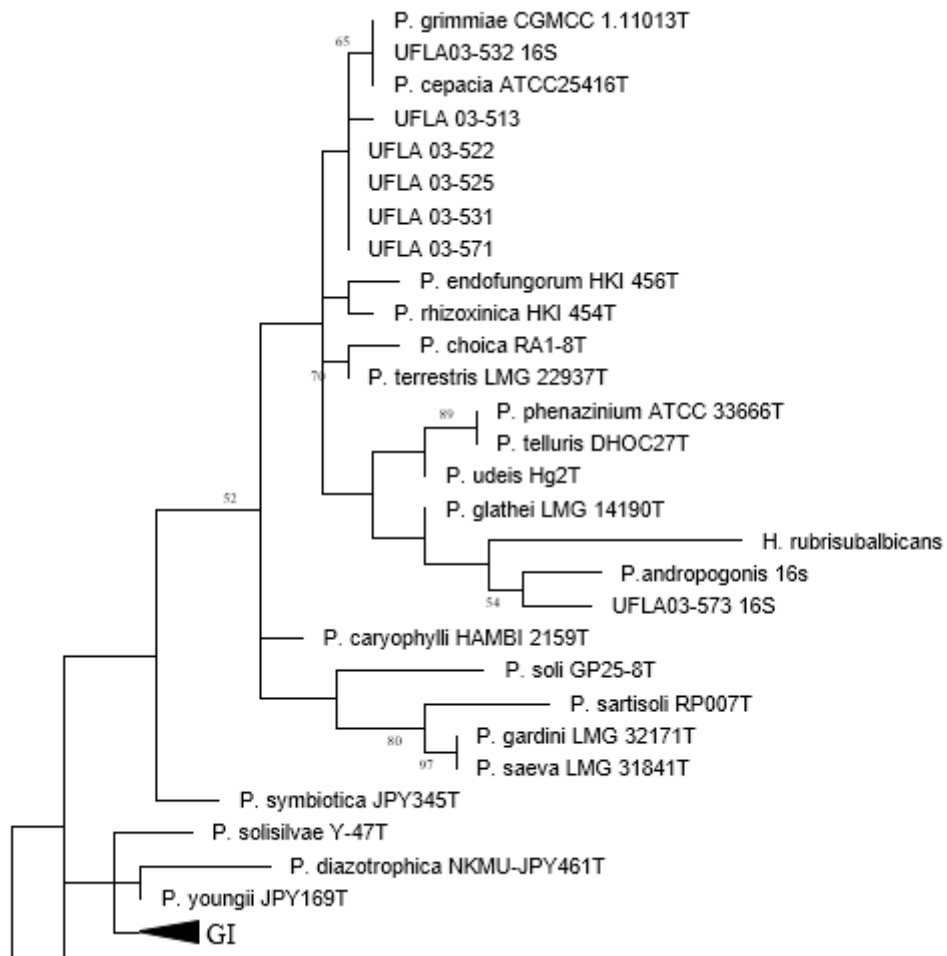
Um outro grupo foi formado com as estirpes de Cerrado, UFLA 03-679, UFLA 03-493, UFLA 03-698, UFLA 03-491, UFLA 03-477, UFLA 03-473 e UFLA 03-461 e a estirpe tipo da espécie *P. guartelaensis* que embora esteja um pouco distante evolutivamente encontra-se dentro do grupo.

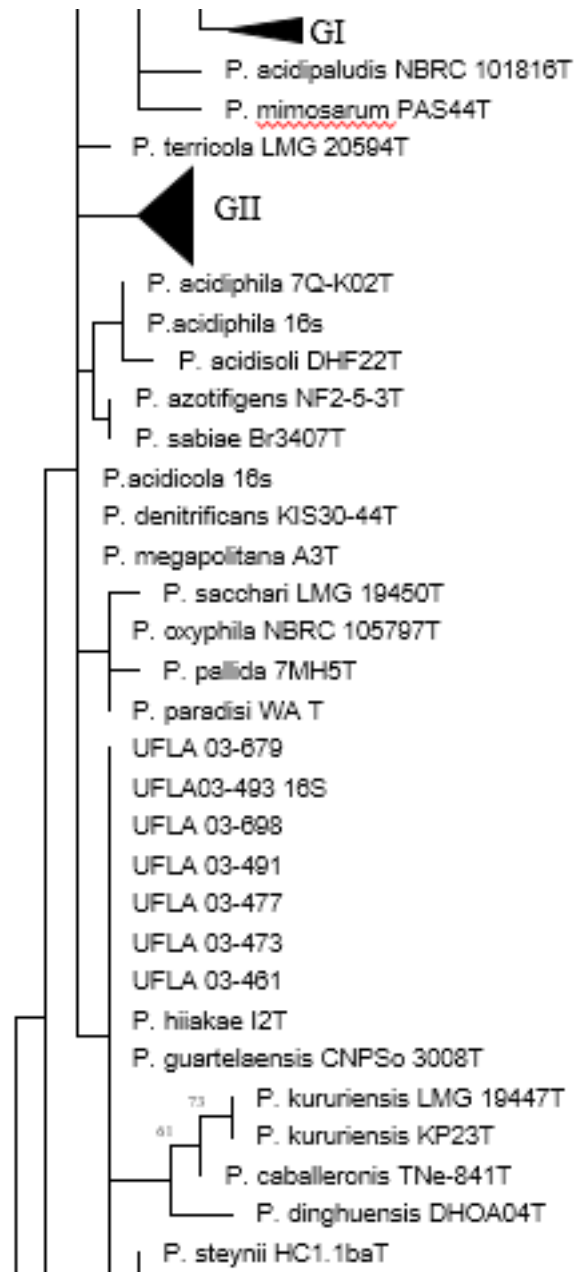
Como observado na figura 1, a estirpe UFLA03-699 posicionou-se separadamente das

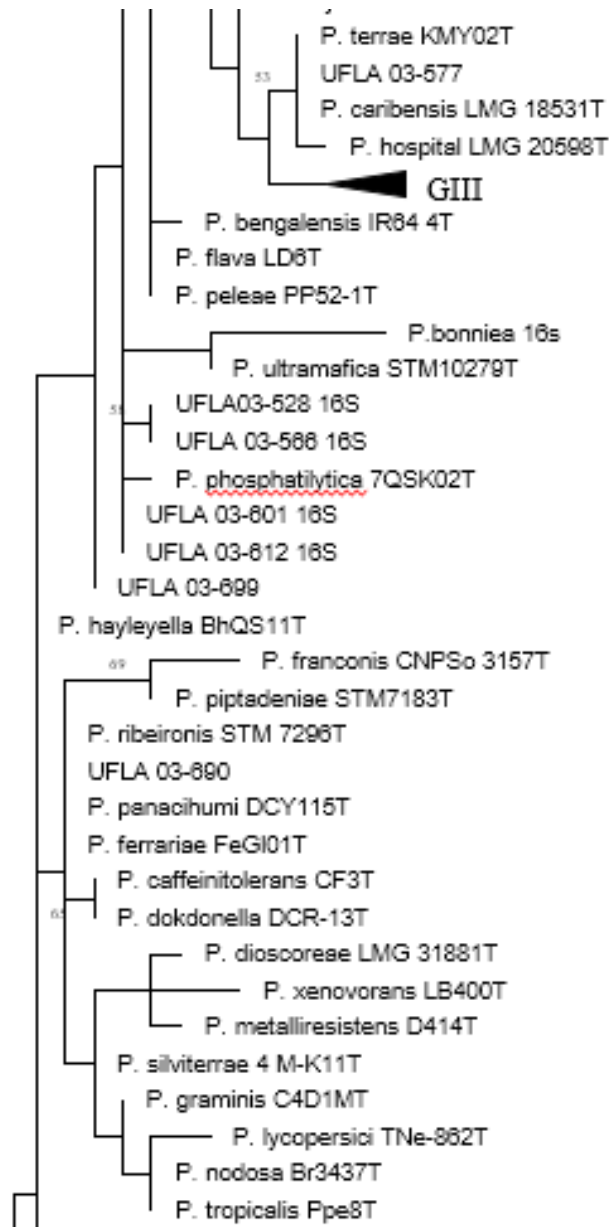
demais estirpes estudadas. Já a estirpe UFLA 03-528 mostrou uma ancestralidade comum a espécie *P. kururiensis*, com um suporte estatístico de 82%. As estirpes UFLA03-601 e UFLA03-612 formaram um clado separado das demais espécies dentro do gênero *Paraburkholderia* e junto da espécie *P. phosphatitica* com um Bootstrap de 99%. Um outro clado com um suporte estatístico de 91% foi formado pelas estirpes: UFLA03-525, UFLA03-571, UFLA03-513, UFLA03-532, UFLA03-522 e UFLA03-531. Dentro desse grupo, observa-se a formação de um subclados com as estirpes UFLA03-532, UFLA03-522 e UFLA03-531. A estirpe UFLA03-573 se posicionou isoladamente quando comparada as estirpes tipo das demais espécies descritas de *Paraburkholderia* e das estirpes UFLA em estudo. Por fim, a estirpe UFLA03-577 pertence ao grupo onde também se encontra a espécie *P. caribensis*.

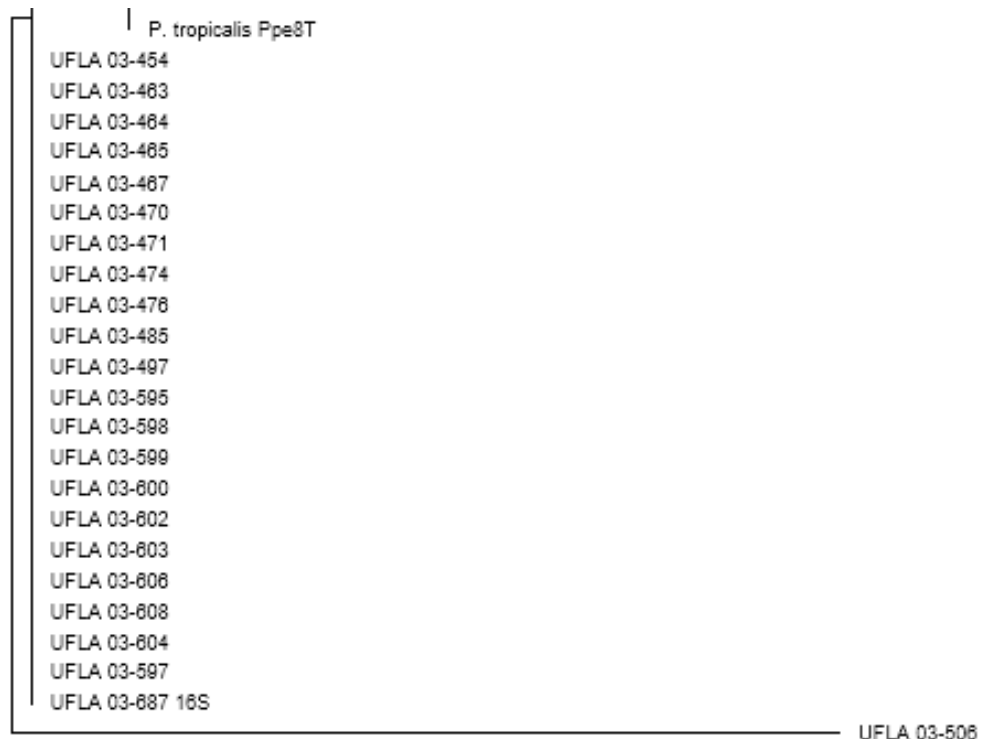
A partir da confirmação do gênero o qual as estirpes em estudo pertencem, decidiu-se avaliar de forma mais profunda se entre as estirpes UFLA havia ou não possíveis novas espécies. Dessa forma, analisou-se a comparação genômica através do ANI.

Figura 1- Filogenia do gene 16S rRNA (380 pb) mostrando a relação evolutiva das estirpes UFLA com as estirpes tipo das espécies de *Paraburkholderia*. Valores de bootstrap maiores que 50% estão indicados nos nós. A sequência do gene 16S rRNA da espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi usada como outgroup. O número de acessos do gene de cada estirpe na árvore está indicado entre parênteses (continua).









(Conclusão)

Fonte: Do autor (2023)

Tabela 3. Grupos de espécies de *Paraburkholderia* (espécies tipo) na árvore filogenética do gene 16S rRNA com todas as estirpes em estudo (Figura 1) (continua).

16S rRNA	GI	<i>P. phenoliruptrix</i> LMG22037 ^T , <i>P. caseinilytica</i> HM451 ^T , <i>P. susongensis</i> L226 ^T , <i>P. eburnea</i> RR11 ^T , <i>P. rhizosphaerae</i> WR43 ^T , <i>P. humisilvae</i> NCAIMB 02543 ^T , <i>P. heleia</i> SA41 ^T , <i>P. silvatlantica</i> LMG 23149 ^T .
	GII	<i>P. podalyriae</i> WC7.3b ^T , <i>P. sprentiae</i> WSM50055 ^T , <i>P. bannensis</i> E25 ^T , <i>P. atlantica</i> CNPSO3155 ^T , <i>P. tuberum</i> STM678 ^T , <i>P. caledonica</i> LMG19076 ^T , <i>P. strydomiana</i> WK1.1.f ^T , <i>P. bryophila</i> LMG23644 ^T , <i>P. panaciterrae</i> DCY85-1 ^T , <i>P. unamae</i> MTI-641 ^T , <i>P. panacisoli</i> DCY113 ^T , <i>P. monticola</i> JC2948 ^T , <i>P. kirstenboschensis</i> Kb15 ^T , <i>P. antibiotica</i> G-4-1-8 ^T , <i>P. ginsengiterrae</i> DCY85 ^T , <i>P. dipogonis</i> ICMP19430 ^T , <i>P. sedimicola</i> HU2-65W ^T , <i>P. aromaticivorans</i> BN5 ^T , <i>P. agricolaes</i> , <i>P. aspalathi</i> , <i>P. caffeinilytica</i> CF1 ^T , <i>P. fungorum</i> LMG1622 ^T , <i>P. ginsengisoli</i> KM03 ^T , <i>P. haematera</i> LMG31837 ^T , <i>P. insulsa</i> PNG-April ^T , <i>P. ginsengisoli</i> KMY03 ^T , <i>P. haematera</i> LMG31837 ^T , <i>P. insulsa</i> PNG-

April^T, *P. madseniana* RP11^T, *P. memoris* LMG31836^T, *P. phytofirmans* PsJN^T, *P. solitsugae* 1N^T

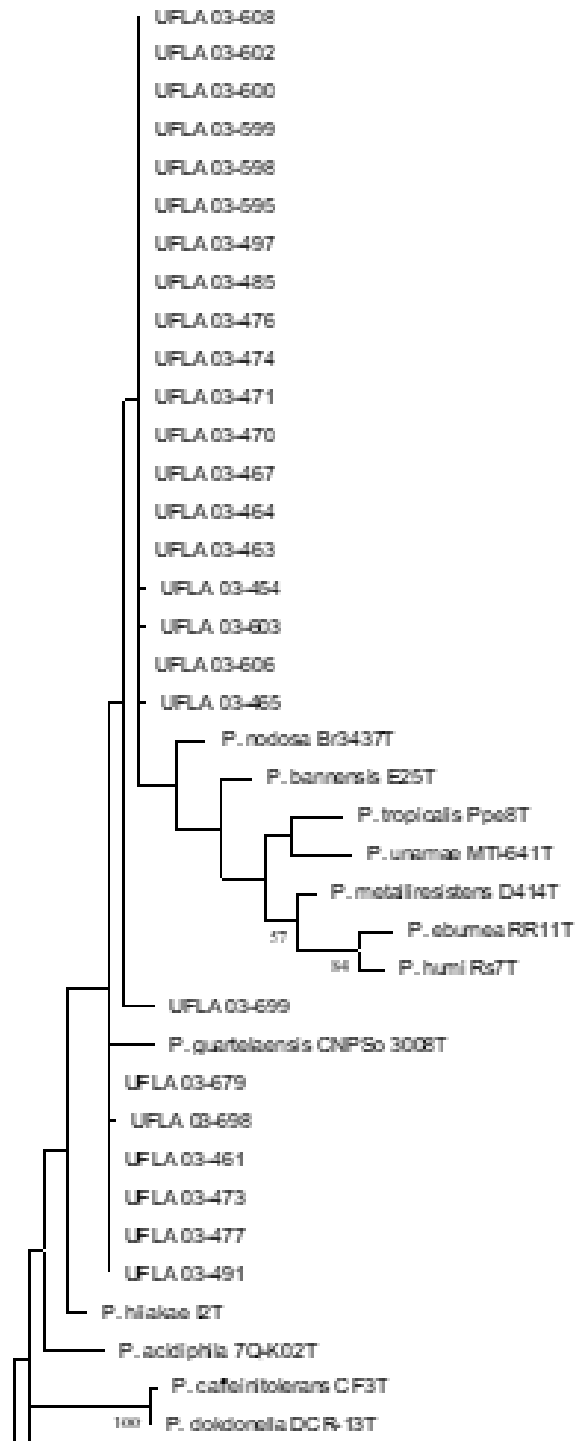
GIII *P. rhynchosiae* WSM3937^T, *P. domus* LMG 31832^T, *P. dilworthii* WSM 3556^T, *P. Polaris* RP-4-7^T, *P. metrosideri* DNBP6-1^T, *P. jirisanensis* JRM2-1^T, *P. fynbosensis* WSM4178^T, *P. lacunae* S27^T

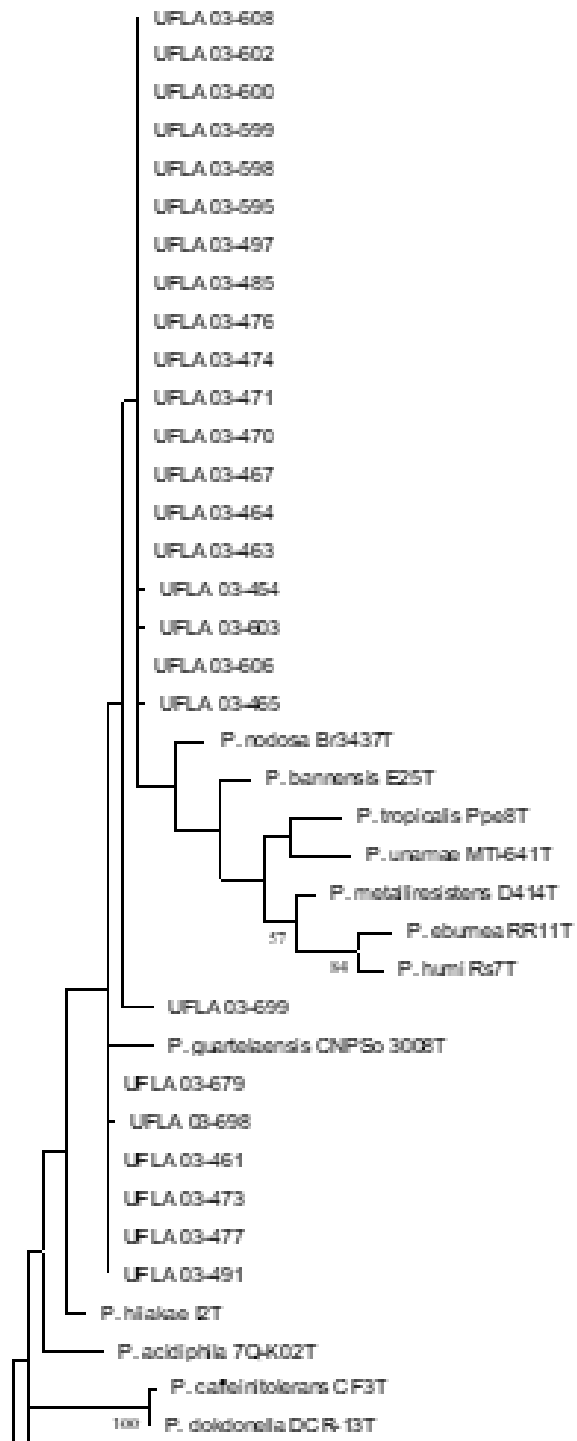
GIII *P. rhynchosiae* WSM3937^T, *P. domus* LMG 31832^T, *P. dilworthii* WSM 3556^T, *P. Polaris* RP-4-7^T, *P. metrosideri* DNBP6-1^T, *P. jirisanensis* JRM2-1^T, *P. fynbosensis* WSM4178^T, *P. lacunae* S27^T

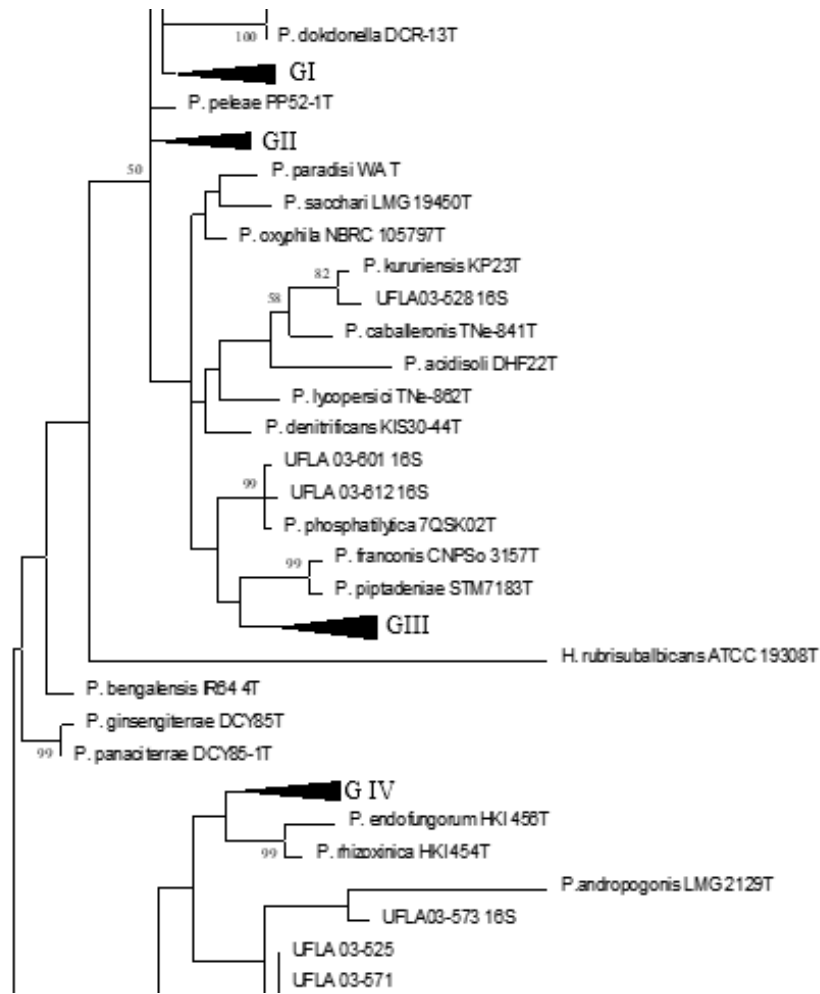
(Conclusão)

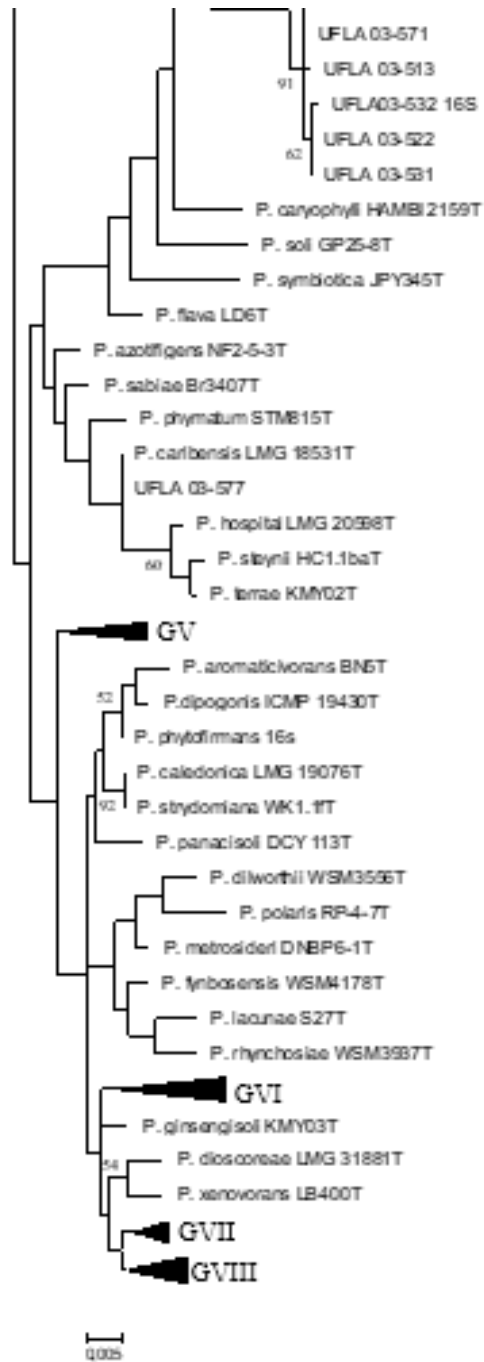
Fonte: Do autor (2023)

Fig 2. Filogenia do gene 16S rRNA (1101pb) mostrando a relação evolutiva das estirpes UFLA com as estirpes tipo das espécies de *Paraburkholderia*. Valores de bootstrap maiores que 50% estão indicados nos nós. A sequência do gene 16S rRNA da espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi usada como outgroup. O número de acessos do gene de cada estirpe na árvore está indicado entre parênteses (continua).









Fonte: Do autor (2023)

Tabela 4 - Grupos de espécies de *Paraburkholderia* (espécies tipo) na árvore filogenética do gene 16S rRNA com todas as estirpes tipo de espécies relacionadas (Figura 2).

16S rRNA	GI	<i>P. mimosarum</i> PAS44 ^T , <i>P. caseinilytica</i> HM451 ^T , <i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 ^T , <i>P. solisilvae</i> Y-47 ^T , <i>P. jirisanensis</i> JRM-1 ^T , <i>P. humisilvae</i> NCAIMB.02543 ^T , <i>P. rhizosphaerae</i> WR43 ^T
	GII	<i>P. heleaia</i> SA41 ^T , <i>P. silvatlantica</i> LMG23149 ^T , <i>P. dirghuensis</i> DHOA04 ^T , <i>P. pallida</i> 7MH5 ^T , <i>P. ferrariae</i> FeGI01 ^T , <i>P. silviterrae</i> 4MK11 ^T
	GIII	<i>P. acidipaludis</i> NBRC 101816 ^T , <i>P. susongensis</i> L226 ^T , <i>P. monticola</i> JC2948 ^T , <i>P. antibiotica</i> G-4-1-8 ^T , <i>P. tuberum</i> STM687 ^T , <i>P. youngii</i> JPY169 ^T , <i>P. atlantica</i> CNPSo 3155 ^T , <i>P. podalyriae</i> WC7.3b ^T , <i>P. sprentiae</i> WSM5005 ^T
	GIV	<i>P. sordidicola</i> LMG 22029 ^T , <i>P. udeis</i> Hg2 ^T , <i>P. glathai</i> LMG 14190 ^T , <i>P. choica</i> RA1-8 ^T , <i>P. terrestris</i> LMG 22937 ^T , <i>P. grimmiae</i> CGMCC1.11013 ^T , <i>P. zhejiangensis</i> OP-1 ^T
	GV	<i>P. panacihumi</i> DCY115 ^T , <i>P. ribeironis</i> STM7296 ^T , <i>P. graminis</i> C4D1M ^T , <i>P. phenoliruptrix</i> LMG 22037 ^T , <i>P. acidicola</i> ATCC31363 ^T , <i>P. megapolitana</i> A3 ^T
	GVI	<i>P. gardini</i> LMG31171 ^T , <i>P. saeva</i> LMG 31841 ^T , <i>P. sartisoli</i> RP007 ^T , <i>P. phenazinium</i> ATCC33666 ^T , <i>P. telluris</i> DHOC27 ^T , <i>P. pallidirosea</i> DHOK13 ^T , <i>P. terricola</i> LMG 20594 ^T , <i>P. ultramafica</i> STM10279 ^T
	GVII	<i>P. fungorum</i> LMG 16225 ^T , <i>P. insulsa</i> PNG-April ^T , <i>P. agricolaris</i> e BaQs159 ^T
	GVIII	

Fonte: Do autor (2023)

Identidade média de nucleotídeos (ANI)

O ANI feito para comparação entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e as estirpes UFLA 03-476, UFLA 03-477, UFLA 03-600 e UFLA 03-699 variou de 77 a 98% para todas elas (ANEXOS A, B, C e D).

Na tabela 5 são apresentados os valores de ANI obtidos e as espécies tipo mais próximas das estirpes em estudo. Os valores de corte entre genomas de mesma espécie são considerados acima de valores entre 95-96% (GORIS et al., 2007; RICHTER & ROSSELLÓ-MÓRA 2009).

Sendo assim a ANI indicou que todas as estirpes pertencem à estirpe tipo descrita como *Paraburkholderia nodosa*.

Tabela 5. ANI de sequências genômicas das estirpes UFLA 03-476, UFLA 03-477, UFLA 03-600 e UFLA 03-699 e espécies tipo relacionadas.

Estirpes em estudo	% ANI	Estirpes tipo
UFLA 03-476	98%	<i>Paraburkholderia nodosa</i> DSM 21604 ^T
UFLA 03-477	98%	<i>Paraburkholderia nodosa</i> DSM 21604 ^T
UFLA 03-600	98%	<i>Paraburkholderia nodosa</i> DSM 21604 ^T
UFLA 03-699	98%	<i>Paraburkholderia nodosa</i> DSM 21604 ^T

Fonte: Do autor (2023)

Tendo em vista que as estirpes que tiveram o DNA genômico sequenciado tiveram ANI de 98% com *Paraburkholderia nodosa*, este resultado confirma o que foi observado pelo trabalho de Chen et al. que relata a simbiose entre *Paraburkholderia nodosa* e plantas de *Mimosa bimucronata* (2005; 2007). A ocorrência desta espécie é relatada em biomas com o Cerrado e a Mata Atlântica (PAULITSCH et al., 2021), o que também corrobora com nossos dados, já que as estirpes UFLA 03-699, UFLA 03-477 e UFLA 03-476 também foram obtidas de solos sob Cerrado. As sequências das estirpes foram depositadas no banco de dados do NCBI e possuem os seguintes números de acesso: UFLA 03-699 (JAUPFD000000000), UFLA 03-600 (JAUPFC000000000) e UFLA 03-477 (JAUPFB000000000), apenas a estirpe UFLA 03-476 não possui número de acesso.

4 Conclusões

A maioria das estirpes de *Paraburkholderia* foi capaz de nodular as plantas de *Mimosa bimucronata*. A estirpe UFLA 03-690 apresentou os maiores valores com relação à matéria seca da parte aérea e ao índice SPAD, destacando-se na eficiência em promover o crescimento desta planta. Além da estirpe UFLA 03-690, as estirpes 03-679, UFLA 03-506, UFLA 03-477, UFLA 03-612 e UFLA 03-608 também aumentaram a produção de matéria seca da parte aérea.

As estirpes UFLA 03-493, UFLA 03-471 e UFLA 03-470 foram eficientes em promover o crescimento vegetal de acordo com os resultados obtidos através do índice SPAD.

A análise filogenética do 16S rRNA mostrou alta diversidade genética entre as estirpes de *Paraburkholderia*.

A identificação das estirpes presentes nos solos das áreas em estudo, pode ser um

primeiro passo para a seleção de estirpes com potencial para uso como inoculantes de plantas como *Mimosa bimucronata*, utilizadas em áreas de recuperação ambiental nestes locais. O uso de bactérias já adaptadas a estes ambientes aumenta as chances de sucesso do estabelecimento das plantas no estágio inicial da revegetação.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, K. S. *et al.* *Burkholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macropodium atropurpureum*. **Revista Ciência Agronômica**. 2017;48(1):41-48. doi: 10.5935/1806-6690.20170005
- BANKEVICH, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- BONTEMPS, C. *et al.* *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>
- CANOSA, G. A. *et al.* Leguminosas florestais fixadoras de nitrogênio da Mata Atlântica brasileira para uso em sistemas agroflorestais e na restauração ecológica. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 2012.
- CASTRO, J. L. *et al.* Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20160525>
- CHEN, W. M. *et al.* Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in Nature. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, 2003. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7266-7272.2003>
- CHEN, W. M. *et al.* Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7461-7471.2005>
- CHEN, W. M. *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64873-0>
- CHEN, W. M. *et al.* *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **Int J Syst Evol Microbiol** 58:2174–2179, 2008. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65816-0>
- Dall'Agnol R. F. *et al.* *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian “Cerradão”. **FEMS Microbiol Ecol**. 2016;92:1-14. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw108>
- DIAS, M. A. M. *et al.* *Paraburkholderia* spp. are the main rhizobial microsymbionts of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. in soils of the Brazilian tropical dry forests (Caatinga

biome). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 126208, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126208>

ELLIOTT, G. N. *et al.* *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 168-180, 2007.
 doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01894.x

FERREIRA, A. S. *et al.* Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 2, p. 441-450, 2010.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01828-09>

FOWLER, J. A. P.; CARPANEZZI, A. A. Tecnologia de sementes de marica (*Mimosa bimucronata* (DC) O. Ktze.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 36, p. 47-56, 1998.

GLICK, B. R. *et al.* Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 7, p. 2567-2572, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.040972710>

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

MAVIMA, L. *et al.* Delineation of *Paraburkholderia tuberum* sensu stricto and description of *Paraburkholderia podalyriae* sp. nov. nodulating the South African legume *Podalyria calyptata*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 126316, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126316>

MISHRA, R. P. N. *et al.* Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS microbiology ecology**, v. 79, n. 2, p. 487-503, 2012.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01235.x>

MITTER, B. *et al.* Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 120, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00120>

NETO, C. B. S. *et al.* *Paraburkholderia atlantica* is the main rhizobial symbiont of *Mimosa* spp. in ultramafic soils in the Brazilian Cerrado biome. **Plant and Soil**, v. 479, n. 1-2, p. 465-479, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05536-9>

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. *et al.* Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1239-1250, 2014.

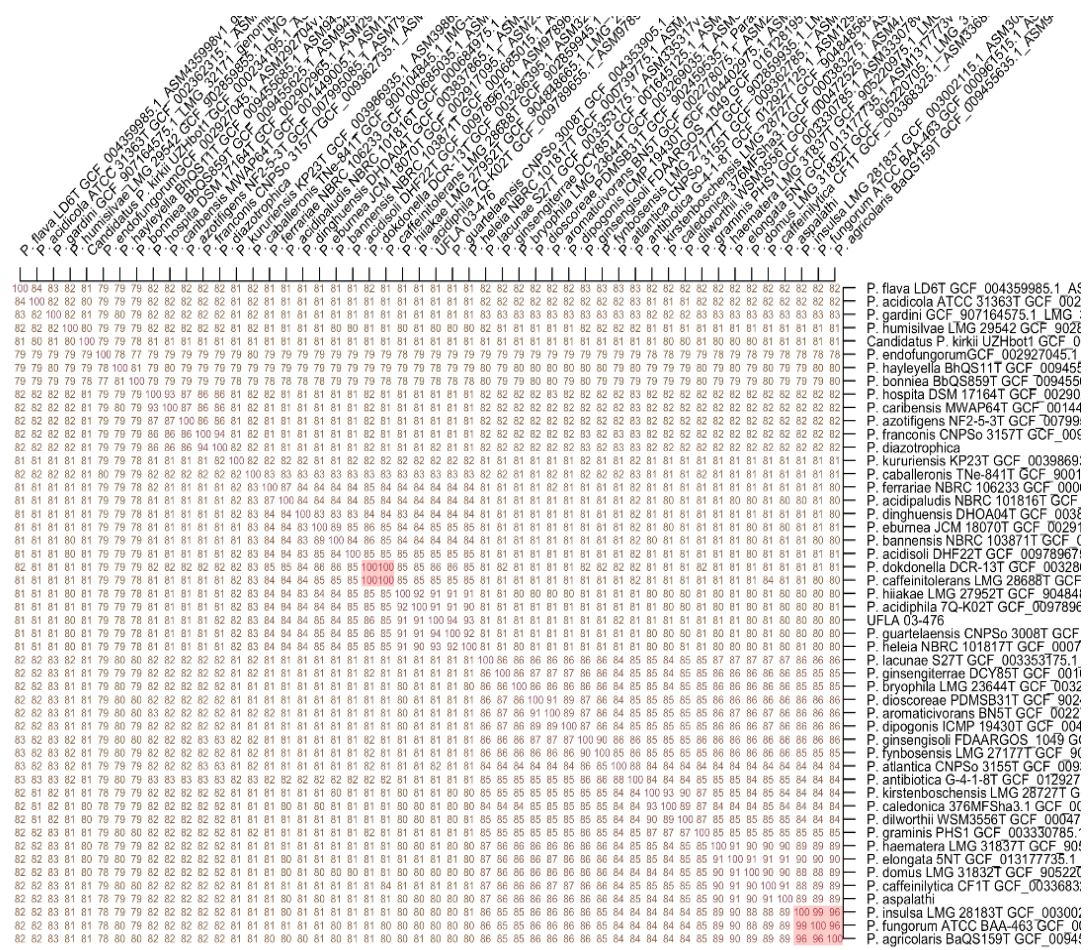
PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome research**, v. 25, n. 7, p. 1043-1055, 2015.
 doi:10.1101/gr.186072.114

PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607-5612, 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>

- PAULITSCH, F. *et al.* *Paraburkholderia atlantica* sp. nov. and *Paraburkholderia franconis* sp. nov., two new nitrogen-fixing nodulating species isolated from Atlantic forest soils in Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1369-1380, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01843-w>
- PRATAMA, A. A. *et al.* Draft genome sequences of three fungal-interactive *Paraburkholderia terrae* strains, BS007, BS110 and BS437. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0293-8>
- RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. **The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes**. PeerJ Preprints, 2016.
<https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>
- SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 429, 2014.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- SHEU, S. Y. *et al.* *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **Int J Syst Evol Microbiol.** 62:2272–2278, 2012.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.037408-0>
- SHEU, S. Y. *et al.* *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **Int J Syst Evol Microbiol** 63:435–441, 2013.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.039859-0>
- SOUZA, M. G. *et al.* Estirpes de *Paraburkholderia* oriundas de Campos Rupestres promovem o crescimento de *Mimosa foliolosa*. **Revista Árvore**, v. 44, 2020. <https://doi.org/10.1590/1806-908820200000012>
- TAPIA-GARCÍA, E. Y. *et al.* *Paraburkholderia lycopersici* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizoplane of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Saladette in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 126133, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126133>
- VIO, S. A. *et al.* *Paraburkholderia*. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, 271–311. 2020.
[doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00015-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00015-0)

ANEXOS

Anexo A - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-476 (continua).



Fonte: Do autor (2023)

Anexo A - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo

P. ultramacula LMG 28614T GCF_90283599.1	100
P. panacisoli DCY113T GCF_008365	99
P. ribeironis STM 7296T GCF_90001	98
P. metrosideri LMG 28140T GCF_90	97
P. xenovorans LB400 GCF_0000136	96
P. phytotfirmans PsJNT GCF_000020	95
P. terricola mHS1 GCF_003330825.1	94
P. rhynchosiae LMG 27174T GCF_90	93
P. phenolipultrix BR3459A GCF_001	92
P. polaris RP-47T GCF_01377695.7	91
P. nemoris LMG 31836T GCF_90522	90
P. madseniana RP11T GCF_009690	89
P. sediminicola LMG 24238T GCF_9	88
P. youngii GCF_013366925.1_ASM1	87
P. tuberum STM678T GCF_9028339	86
P. spreintiae WSM5005T GCF_0018	85
P. podalyriiae GCF_014397785.1 AS	84
P. monticola JC2948T GCF_001580	83
P. susongensis LMG 29540 GCF_90	82
P. telluris DHO22T GCF_00342900	81
P. phenazineum LMG 2247T GCF_90	80
P. sartisoli LMG 24000T GCF_90010	79
P. saeva GCF_907164555.1_LMG_3	78
P. phosphatilyca 7QSK02T GCF_0C	77
P. megapolitana LMG 23650T GCF_1	76
P. solisilvae LMG 29739 GCF_90285	75
P. rhizosphaerae LMG 29544 GCF_1	74
P. terrae DSM 17804T GCF_002902	73
P. pipitadeniae STM 7183T GCF_900	72
P. sabiae LMG 24235T GCF_90484	71
P. phymatum STM815T GCF_00020	70
P. pallida 7MH5T GCF_004524855.1	69
P. oxyphila NBRC 105797T GCF_00	68
P. silviterrae	67
P. sacchari LMG 19450 GCF_00078	66
P. tropica LMG 22274T GCF_902833	65
P. unamae SCZA-39 GCF_0030989	64
P. lycopersici TNe-862T GCF_90009	63
P. mimosarum LMG 23256T GCF_0C	62
UFLA 03-476	61
P. nodosa DSM 21604 GCF_000519	60
P. silvaticana SRCL-318 GCF_0032	59

de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-476 (continua).

Fonte: Do autor (2023)

Anexo A - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-476 (conclusão).

	GCA_007097545.1	GCA_002879935.1	GCA_902859815.1	GCF_000198775.1	GCA_902833845.1	GCF_902459535.1	GCF_001645135.1	GCA_000300095.1	GCA_007995085.1	UFLA 03-476	GCA_003837865.1	GCF_001544535.1	GCA_000751215.2	GCA_001544515.2	GCA_001544475.2	GCF_022879615.1	GCA_022879815.1
GCA_007097545.1	100	81	81	79	77	80	79	80	80	80	80	80	80	80	79	80	80
GCA_002879935.1	81	100	81	79	77	79	80	81	80	80	80	79	80	79	79	79	79
GCA_902859815.1	81	81	100	79	78	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
GCF_000198775.1	79	79	79	100	78	79	79	79	79	78	78	79	79	79	78	79	79
GCA_902833845.1	77	77	78	78	100	78	78	78	77	77	78	77	78	78	77	78	78
GCF_902459535.1	80	79	80	79	78	100	87	85	82	81	81	81	81	81	81	81	80
GCF_001645135.1	79	80	80	79	78	87	100	85	82	81	81	81	81	81	81	80	80
GCA_000300095.1	80	81	80	79	78	85	85	100	82	81	81	81	81	81	81	81	81
GCA_007995085.1	80	80	80	79	77	82	82	82	100	81	81	81	81	81	81	81	81
UFLA 03-476	80	80	80	78	77	81	81	81	81	100	84	80	80	80	80	80	80
GCA_003837865.1	80	80	80	78	78	81	81	81	81	84	100	81	81	80	80	80	81
GCF_001544535.1	80	79	80	79	77	81	81	81	81	80	81	100	86	87	87	82	82
GCA_000751215.2	80	80	80	79	78	81	81	81	81	80	81	86	100	85	85	83	83
GCA_001544515.2	80	79	80	79	78	81	81	81	81	80	80	87	85	100	94	82	82
GCA_001544475.2	79	79	80	78	77	81	81	81	81	80	80	87	85	94	100	82	82
GCF_022879615.1	80	79	80	79	78	81	80	81	81	80	80	82	83	82	82	100	84
GCA_022879815.1	80	79	80	79	78	80	80	81	81	80	81	82	83	82	82	84	100

Fonte: Do autor (2023)

Anexo B - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-477 (continua).

	GCA_007097545.1	GCA_002879935.1	GCA_902859815.1	GCF_000198775.1	GCA_902833845.1	GCF_902459535.1	GCF_001645135.1	GCA_000300095.1	GCA_007995085.1	UFLA 03-477	GCA_003837865.1	GCF_001544535.1	GCA_000751215.2	GCA_001544515.2	GCA_001544475.2	GCF_022879615.1	GCA_022879815.1
GCA_007097545.1	100	81	81	79	77	80	79	80	80	80	80	80	80	80	79	80	80
GCA_002879935.1	81	100	81	79	77	79	80	81	80	81	80	79	80	79	79	79	79
GCA_902859815.1	81	81	100	79	78	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
GCF_000198775.1	79	79	79	100	78	79	79	79	79	79	78	79	79	78	79	79	79
GCA_902833845.1	77	77	78	78	100	78	78	78	77	77	78	77	78	78	77	78	78
GCF_902459535.1	80	79	80	79	78	100	87	85	82	81	81	81	81	81	81	81	80
GCF_001645135.1	79	80	80	79	78	87	100	85	82	81	81	81	81	81	81	80	80
GCA_000300095.1	80	81	80	79	78	85	85	100	82	81	81	81	81	81	81	81	81
GCA_007995085.1	80	80	80	79	77	82	82	82	100	81	81	81	81	81	81	81	81
UFLA 03-477	80	81	80	79	77	81	81	81	81	100	84	80	80	80	80	80	80
GCA_003837865.1	80	80	80	78	78	81	81	81	81	84	100	81	81	80	80	80	81
GCF_001544535.1	80	79	80	79	77	81	81	81	81	80	81	100	86	87	87	82	82
GCA_000751215.2	80	80	80	79	78	81	81	81	81	80	81	86	100	85	85	83	83
GCA_001544515.2	80	79	80	79	78	81	81	81	81	80	80	87	85	100	94	82	82
GCA_001544475.2	79	79	80	78	77	81	81	81	81	80	80	87	85	94	100	82	82
GCF_022879615.1	80	79	80	79	78	81	80	81	81	80	80	82	83	82	82	100	84
GCA_022879815.1	80	79	80	79	78	80	80	81	81	80	81	82	83	82	82	84	100

Fonte: Do autor (2023)

Anex

es tipo

P. ultramacra LMG 28614T GCF_90	P. panacisoli DCY113T GCF_00836S	P. ribeironis STM 7296T GCF_90001	P. metrosideri LMG 28140T GCF_90	P. xenovorans LB400 GCF_0000136	P. phytofirmans PajNT GCF_00002C	P. terricola mHS1 GCF_003330825.2	P. rhynchosiae LMG 27174T GCF_9	P. phenoliruptrix BR3459a GCF_000	P. solisusgae 1NT GCF_013177895.1	P. polaris RP-4-7T GCF_012927345	P. memoris LMG 31836T GCF_80522	P. madseniana RP11T GCF_006990	P. sediminicola LMG 24238T GCF_9	P. youngii GCF_013368925.1_ASM1	P. Liberum STM678T GCF_9028339	P. sprentiae WSM5005T GCF_0018f	P. podalyriae GCF_014397785.1_AS	P. monticola JC2948T GCF_001580f	P. susongensis LMG 29540 GCF_90	P. telluris DHC27T GCF_00342900	P. phenazinium LMG 2247T GCF_9c	P. sarisoli LMG 24000T GCF_90010	P. saeva GCF_907164555.1_LMG_3	P. phosphatilytica 70SK02T GCF_0c	P. megapoliitana LMG 23650T GCF	P. solisilvae LMG 29739 GCF_9026f	P. rhizosphaerae LMG 29544 GCF_1	P. terrae DSM 17804T GCF_002902	P. ptiptadeniae STM 1783T GCF_90C	P. sabiae LMG 24235T GCF_90484f	P. phymatum STM815T GCF_00002	P. pallida 7MHS1T GCF_004524855.1	P. oxyphila NBRC 105797T GCF_00	P. silviterrae	P. sacchari LMG 19450 GCF_00078f	P. tropica LMG 22274T GCF_90283f	P. unamae SC2a-39 GCF_00309687	P. lycopersici TN-862T GCF_90009	P. mimosarum LMG 23256T GCF_0f	UFLA 03-477	P. nodosa DSM 21604 GCF_000519	P. silvaticola SRCL-318 GCF_00032
---------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------	-------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------	----------------	----------------------------------	----------------------------------	--------------------------------	----------------------------------	--------------------------------	-------------	--------------------------------	-----------------------------------

Fonte: Do autor (2023)

Anexo C - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-600 (continua).

Strain	ANI (%)
P. flava LD6T GCF_004359985.1 AS	100
P. acidicola ATCC 31363T GCF_002	84
P. gardineri GCF_907164575.1 LMG	83
P. humilisvae LMG 29542 GCF_9028	82
Candidatus P. kiriki UZHb01 GCF_0	81
P. endofungorum GCF_002927045.1	79
P. hayleyella BHO511T GCF_009453	78
P. bonniea BbQ5859T GCF_0094559	77
P. hospita DSM 17164T GCF_00290	76
P. caribensis MWAP64T GCF_00144	75
P. azotifigens NF2-5-3T GCF_00799	74
P. francosis CNPSo 3157T GCF_005	73
P. diazotrophica	72
P. kururitelensis KP23T GCF_0039869	71
P. caballeronis TNe-841T GCF_9001	70
P. ferrariae NBRC 106233 GCF_0009	69
P. acidipaludis NBRC 101816T GCF	68
P. dinghuensis DHOA04T GCF_0038	67
P. eburnea JCM 18070T GCF_00291	66
P. bannensis NBRC 103871T GCF_0	65
P. adifolii DHF22T GCF_00978967	64
P. dokdonella DCR-13T GCF_00328	63
P. cafferintolerans LMG 2868T GCF	62
P. hiakiae LMG 27952T GCF_90484	61
P. acidiphila 70-K02T GCF_0097896	60
UFLA 03-600	60
P. guarielensis CNPSo 3008T GCF	59
P. hialeia NBRC 101817T GCF_0007	58
P. lacunae S27T GCF_003353175.01	57
P. ginsengiterrae DCY85T GCF_0011	56
P. bryophila LMG 23644T GCF_0032	55
P. gossypiae PDMSB31T GCF_902	54
P. aromatisivorans BN5T GCF_0022	53
P. dipogonis ICMP 19430T GCF_004	52
P. ginsengisoli FDAARGOS 1049 G	51
P. lyngbyensis LMG 27177T GCF_9	50
P. atlantica CNPSo 3155T GCF_009	49
P. antibiotica G-4-1-BT GCF_012927	48
P. kirstenboschensis LMG 28727T G	47
P. caledonia 376MFShaa3.1 GCF_0	46
P. diworthii WSM3561T GCF_00047	45
P. graminis PHS1 GCF_003303785.9	44
P. haematera LMG 31837T GCF_90	43
P. elongata 5NT GCF_01317735.1	42
P. domus LMG 31832T GCF_90522	41
P. cafferintolifer CF1T GCF_0033683	40
P. aspalathi	39
P. insulsa LMG 28183T GCF_00300	38
P. fungorum ATCC BAA-463 GCF_0	37
P. agricola BQ519T GCF_0094	36

Fonte: Do autor (2023)

Anexo C - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-600 (conclusão).

	GCA_007097545.1_Paraburkholderia ca.	GCA_002879935.1_Paraburkholderia sy	GCA_902859815.1_Paraburkholderia so.	GCF_000198775.1_Paraburkholderia rfm.	GCA_902833845.1_Paraburkholderia an.	GCF_902459535.1_Paraburkholderia di.	GCF_001646135.1_Paraburkholderia pa.	GCA_000300095.1_Paraburkholderia ph	UFLA 03-600	GCA_003837865.1_Paraburkholderia dh.	GCF_001544535.1_Paraburkholderia chv.	GCA_000751215.2_Paraburkholderia gh.	GCA_001544515.2_Paraburkholderia ten.	GCF_022879815.1_Paraburkholderia hu.	GCA_022879815.1_Paraburkholderia gn.	GCA_022879815.1_Paraburkholderia zh.	
100	81	81	79	77	80	79	80	80	80	80	80	80	79	80	80	GCA_007097545.1_Paraburkholderi;	
81	100	81	79	77	79	80	81	80	80	80	79	80	79	79	79	GCA_002879935.1_Paraburkholderi;	
81	81	100	79	78	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	GCA_902859815.1_Paraburkholderi;	
79	79	79	100	78	79	79	79	79	78	78	79	79	79	78	79	GCF_000198775.1_Paraburkholderi;	
77	77	78	78	100	78	78	78	77	77	78	77	78	78	77	78	GCA_902833845.1_Paraburkholderi;	
80	79	80	79	78	100	87	85	82	81	81	81	81	81	81	81	GCF_902459535.1_Paraburkholderi;	
79	80	80	79	78	87	100	85	82	81	81	81	81	81	81	80	GCF_001646135.1_Paraburkholderi;	
80	81	80	79	78	85	85	100	82	81	81	81	81	81	81	81	GCA_000300095.1_Paraburkholderi;	
80	80	80	79	77	82	82	82	100	81	81	81	81	81	81	81	GCA_007995085.1_Paraburkholderi;	
80	80	80	78	77	81	81	81	81	100	84	80	80	80	80	80	UFLA 03-600	
80	80	80	78	78	81	81	81	81	84	100	81	81	80	80	81	GCA_003837865.1_Paraburkholderi;	
80	79	80	79	77	81	81	81	81	80	81	100	86	87	87	82	GCF_001544535.1_Paraburkholderia	
80	80	80	79	78	81	81	81	81	80	81	86	100	85	85	83	GCA_000751215.2_Paraburkholderi;	
80	79	80	79	78	81	81	81	81	80	80	87	85	100	94	82	GCA_001544515.2_Paraburkholderi;	
79	79	80	78	77	81	81	81	81	80	80	87	85	94	100	82	GCA_001544475.2_Paraburkholderi;	
80	79	80	79	78	81	80	81	81	80	80	82	83	82	82	100	84	GCF_022879815.1_Paraburkholderi;
80	79	80	79	78	80	80	81	81	80	81	82	83	82	82	84	100	GCA_022879815.1_Paraburkholderi;

Fonte: Do autor (2023).

Anexo D - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-699 (continua).

Flava LD6T GCF 004359895.1 ASM4359895.1
acidicola ATCC 31363T GCF 002
gardini GCF 907164575.1 LMG 3
humilisviva LMG 29542 GCF 9022
Candidatus P. kirku UZHbot GCF 0
endofungorum GCF 002927045.1
hayleyella BQSQ111 GCF 009456
bonniea BbQS859T GCF 009455
hospita DSM 17164T GCF 00290
caribensis MWAF64T GCF 00144
azotifigans NF2-5-3T GCF 00799
francois CNPSo 3157T GCF 006
diázotófica
kururienensis KP23T GCF 0039868
caballeronis TNe-841T GCF 3001
ferrariae NBRC 106233 GCF 000
acidipaludis NBRC 101816T GCF
dinghuensis DHOA04T GCF 0036
eburnea JCM 18070T GCF 00291
bannensis NBRC 103871T GCF 0
acidisoli DHP22T GCF 00978967
dokdonella DCR-13T GCF 00328
caffeinitolerans LMG 28688T GCF
hitakae LMG 27852T GCF 00484
acidiphila 7Q-K02T GCF 0097896
UFLA 03-699
guartelaensis CNPSo 3008T GCF
heleia NBRC 101817T GCF 0007
lacunae S2T GCF 003353175.1
pingsentierae DCY85T GCF 001
bryophila LMG 23644T GCF 0036
dioscoreae PDMS531T GCF 902
aromaticivorans BNS1 GCF 0022
dipogonis ICMP 19430T GCF 004
pingsensolii FDAARGOS 1049 G
lymbosensis LMG 27177T GCF 90
atlantica CNPSo 3155T GCF 009
antibiotica G-4-1-8T GCF 012927
kirstenboschensis LMG 28727T G
caledonica 376MF Sha3.1 GCF 0
dillworthii WSM356T GCF 00047
graminis PHS1 GCF 00330785.
haematera LMG 31837T GCF 904
elongata 5NT GCF 013177735.1
domus LMG 31832T GCF 90522
caffeinitolera CF1T GCF 0033683
aspalathi
insulsa LMG 28183T GCF 00300
fungorum ATCC BAA-463 GCF 0
agnicola BqQS159T GCF 0094

Fonte: Do autor (2023)

Anexo D - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo

	GCA_007097545.1_Paraburkholderia ca.	GCA_002879935.1_Paraburkholderia sy.	GCA_902859815.1_Paraburkholderia so.	GCF_000198775.1_Paraburkholderia rhu.	GCA_902833845.1_Paraburkholderia rhu.	GCF_902459535.1_Paraburkholderia an.	GCF_001645135.1_Paraburkholderia dit.	GCA_000300095.1_Paraburkholderia pa.	GCA_007995085.1_Paraburkholderia pl.	UFLA 03-699	GCA_003837865.1_Paraburkholderia az.	GCF_001544535.1_Paraburkholderia dit.	GCA_000751215.2_Paraburkholderia cho.	GCA_0015444515.2_Paraburkholderia gl.	GCF_022879615.1_Paraburkholderia ter.	GCA_0022879815.1_Paraburkholderia hu.	GCA_0022879815.1_Paraburkholderia gn.	GCA_0022879815.1_Paraburkholderia zh.
100	81	81	79	77	80	79	80	80	80	80	80	80	80	79	80	80		GCA_007097545.1_Paraburkholderi
81	100	81	79	77	79	80	81	80	80	80	79	80	79	79	79	79		GCA_002879935.1_Paraburkholderi
81	81	100	79	78	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80		GCA_902859815.1_Paraburkholderi
79	79	79	100	78	79	79	79	79	78	78	79	79	79	78	79	79		GCF_000198775.1_Paraburkholderi
77	77	78	78	100	78	78	78	77	77	78	77	78	78	77	78	78		GCA_902833845.1_Paraburkholderi
80	79	80	79	78	100	87	85	82	81	81	81	81	81	81	81	80		GCF_902459535.1_Paraburkholderi
79	80	80	79	78	87	100	85	82	81	81	81	81	81	81	80	80		GCF_001645135.1_Paraburkholderi
80	81	80	79	78	85	85	100	82	81	81	81	81	81	81	81	81		GCA_000300095.1_Paraburkholderi
80	80	80	79	77	82	82	82	100	81	81	81	81	81	81	81	81		GCA_007995085.1_Paraburkholderi
80	80	80	78	77	81	81	81	81	100	84	80	80	80	80	80	80		UFLA 03-699
80	80	80	78	78	81	81	81	81	84	100	81	81	80	80	80	81		GCA_003837865.1_Paraburkholderi
80	79	80	79	77	81	81	81	81	80	81	100	86	87	87	82	82		GCF_001544535.1_Paraburkholderi
80	80	80	79	78	81	81	81	81	80	81	86	100	85	85	83	83		GCA_000751215.2_Paraburkholderi
80	79	80	79	78	81	81	81	81	80	80	87	85	100	94	82	82		GCA_0015444515.2_Paraburkholderi
79	79	80	78	77	81	81	81	81	80	80	87	85	94	100	82	82		GCA_001544475.2_Paraburkholderi
80	79	80	79	78	81	80	81	81	80	80	82	83	82	82	100	84		GCF_022879615.1_Paraburkholderi
80	79	80	79	78	80	80	81	81	80	81	82	83	82	82	84	100		GCA_0022879815.1_Paraburkholderi

de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-699 (continua).

Fonte: Do autor (2023)

Anexo D - Identidade media de nucleotídeos (ANI) realizada entre o genoma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* e a estirpe UFLA 03-699 (conclusão).

Strain	ANI (%)
<i>P. ultramacra</i> LMG 28614T GCF_902855915.1 LM	90
<i>P. panacisoli</i> DCY113T GCF_00339934.1 LM	89
<i>P. rubeironis</i> STM 7296T GCF_902855915.1 LM	88
<i>P. metrosideri</i> LMG 28140T GCF_90	87
<i>P. xenovorans</i> LB400 GCF_0000736	86
<i>P. phytotfirmans</i> PJsNT GCF_000020	85
<i>P. terricola</i> hMS1 GCF_003330825.1	84
<i>P. rhynchosiae</i> LMG 27174T GCF_90	83
<i>P. youngii</i> GCF_013366925.1 ASM1	82
<i>P. solitsugae</i> INT GCF_013177695.1	81
<i>P. polaris</i> RP-4-7T GCF_012927345	80
<i>P. nemoris</i> LMG 31836T GCF_90522	79
<i>P. madseni</i> RP11T GCF_009690	78
<i>P. sediminicola</i> LMG 24238T GCF_9	77
<i>P. tuberum</i> STM787T GCF_90728339	76
<i>P. sprentiae</i> WSM5005T GCF_0018F	75
<i>P. podalyriae</i> GCF_014397785.1 AS	74
<i>P. monticola</i> JC2948T GCF_001580T	73
<i>P. susongensis</i> LMG 29540 GCF_90	72
<i>P. telluris</i> DHOC27T GCF_00342900	71
<i>P. phoenizium</i> LMG 2247T GCF_90	70
<i>P. sartisoli</i> LMG 24000T GCF_90010	69
<i>P. saeva</i> GCF_907164555.1 LM3	68
<i>P. phosphatilytica</i> 70SK02T GCF_0	67
<i>P. megapolitana</i> LMG 23650T GCF_0	66
<i>P. solisilvae</i> LMG 29739 GCF_90285	65
<i>P. rhizosphaerae</i> LMG 28544 GCF_0	64
<i>P. terrae</i> DSM 17804T GCF_002902	63
<i>P. pipitadeniae</i> STM 1783T GCF_900	62
<i>P. sabiae</i> LMG 24235T GCF_90484E	61
<i>P. phymatum</i> STM815T GCF_00002	60
<i>P. pallida</i> 7MH5T GCF_004524855.1	59
<i>P. oxyphila</i> NBRC 105797T GCF_000	58
<i>P. silviterae</i>	57
<i>P. sacchari</i> LMG 19450 GCF_00078T	56
<i>P. tropica</i> LMG 22274T GCF_90283T	55
<i>P. unamae</i> SCZa-39 GCF_00309687	54
<i>P. lycopersici</i> TNe-862T GCF_90009	53
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256T GCF_00	52
<i>P. nodosa</i> DSM 21604 GCF_000519	51
<i>P. silvatica</i> SRCL-318 GCF_0032	50

Fonte: Do autor (2023)