



LUCAS LENIN RESENDE DE ASSIS

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE
PLANTAS ASSOCIADAS À *Pereskia aculeata* Mill.: POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO**

**LAVRAS – MG
2023**

LUCAS LENIN RESENDE DE ASSIS

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
ASSOCIADAS À *Pereskia aculeata* MILL.: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E
IDENTIFICAÇÃO**

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

Profa. 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).

Assis, Lucas Lenin Resende.

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas à *Pereskia aculeata* Mill.: Potencial biotecnológico e identificação / Lucas Lenin Resende Assis. - 2023.

134 p. : il.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Bactérias associativas. 2. Alimentícias não convencionais. 3. Cactácea. I. Moreira, Fatima Maria de Souza. II. Título.

LUCAS LENIN RESENDE DE ASSIS

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
ASSOCIADAS À *Pereskia aculeata* MILL.: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E
IDENTIFICAÇÃO**

**PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA ASSOCIATED WITH *Pereskia
aculeata* MILL.: BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND IDENTIFICATION**

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

APROVADO em 27 de janeiro de 2023.

Dra. Elaine Martins da Costa	UFPI
Dr. Felipe Haenel Gomes	UFLA
Dra. Márcia Rufini	UFLA
Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega	UFRB

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

A meus pais, Imaculada Conceição e Osvaldo de Assis, meu irmão Mateus e meu companheiro de vida, Juliano, os quais foram meu alicerce durante esse tempo, sem a ajuda e amor de vocês, nada disso poderia se tornar realidade.

Obrigado a todos pela forma que agiram!

À minha filha, à Neliane pela compreensão que tiveram e amor, acima de tudo. Sempre fui um vitorioso e essa vitória pertence a todos nós.

Aos amigos que fiz em Lavras e que puderam colaborar com parcerias e amizade.

À mãe natureza, que provê com amor e prontidão tudo do que necessitamos para sobreviver.

A todos os que puderam colaborar de certa forma com essa conquista.

Obrigado mais uma vez, amo vocês e...

DEDICO ESTA TESE.

AGRADECIMENTOS

Pelas oportunidades, pelas pessoas e pelo trabalho que encontrei em meu caminho durante essa trajetória, me fazendo crescer e me desenvolver da melhor maneira possível.

Aos meus pais: Imaculada e Osvaldo, pela fonte de inspiração e suporte para que nada me faltasse, abrindo portas para um futuro amplo e de sonhos a serem realizados. O orgulho que tenho de vocês é imensurável, assim como o amor.

Ao meu companheiro de vida, Juliano, madrinha Dulcilene, aos meus avós e ti_s, pelo apoio e amor.

A minha filha Luísa e sua mãe, Neliane, pelo apoio incondicional e por estar sempre por perto, tornando a distancia da minha cidade natal um pouco menor.

A_s amig_s de festas e barzinhos, pela amizade, apoio, convívio e por serem a minha família longe de casa. Em especial a Juliana e Alexandre, Régis, Gabriel, Thiago, Jessyca, Luana e Silmara, por dispor do seu tempo para cederam sementes que deram vida a esse trabalho.

A Eliane Oliveira e à Bruna Ortiz que me acompanharam mais de perto, e se estendem a todos aqueles, colegas de trabalho do Departamento de Microbiologia do Solo e Ciências do Solo - DCS, que cooperaram indiretamente nessa etapa da minha vida.

A professora Fatima Maria de Souza Moreira, por acreditar na minha capacidade e por me orientar durante quase toda a graduação, e agora no doutorado, rendendo um currículo forte e que me abrirá muitas portas no futuro. E mais que isso, pela amizade, preocupações e por todo apoio.

A todos os funcionários da UFLA, Denise, Alessandra, Maria Alice, à Dirce e professores que me deram todo suporte e a base do conhecimento para poder prosseguir nesta caminhada acadêmica pelo mundo.

À CAPES e à ciência do Brasil, ao nosso presidente Luiz Inácio Lula da Silva, que colaboraram com o financiamento da pesquisa, sem o seu apoio nada disso seria possível. Além do DCS, UFLA, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG e o CNPq, pelo auxílio financeiro necessário para a realização desse trabalho.

“Quem quer civilizar o Brasil não pode temer o poder. Temos de nos livrar dessa alma de senhor de escravo.” (Silvio Almeida).

RESUMO GERAL

A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) é uma espécie rústica que se desenvolve bem em solos diversos, que não necessariamente tenham sido adubados. Além disso, o cultivo e consumo dessa planta, assim como outras plantas alimentícias não convencionais, contribuem para a promoção da segurança alimentar e nutricional pelo seu valor na preservação e resgate da cultura alimentar. Estudos com plantas alimentícias não convencionais ainda corroboram pela sua relevância na construção e manutenção de um sistema alimentar mais saudável e sustentável. Estudos anteriores desenvolvidos por Vega et al. (2020), constaram que o elevado teor proteico da ora-pro-nóbis não está relacionado com a matéria orgânica ou teor de nitrogênio no solo e foram identificadas a ocorrência de bactérias associativas do gênero *Azospirillum* de maneira predominante em raízes e na rizosfera da planta. O gênero *Azospirillum* representa um importante grupo de bactérias associativas que apresenta a capacidade de promoção do crescimento vegetal. Dessa maneira o objetivo do estudo foi compreender o comportamento dessa planta sob condições hídricas mínimas e a resposta da microbiota associada ao ora-pro-nóbis com o auxílio de indicadores biológicos, além de testar estirpes anteriormente isoladas (UFLA0261, UFLA0267^T, UFLA0306^T, UFLA0324, UFLA0346 e UFLA0327^T), separadamente em ora-pro-nóbis, coinoculadas em feijão caupi (cultivar quarentão) e análise genômica de algumas estirpes previamente selecionadas (UFLA0325^T, UFLA0267^T, UFLA0327^T e UFLA0306^T). Os parâmetros microbianos, com poucas exceções, não variaram entre os métodos de propagação e quando comparados ao longo do tempo. Para o carbono da biomassa microbiana verificou-se valores mais elevados com 14 dias consecutivos de suspensão da irrigação no tratamento com plantas oriundas de sementes e no controle irrigado em estacas. A respiração da biomassa do solo foi maior no tratamento controle e com 32 dias sem irrigação, para propagação via sementes. Os ensaios com coinoculação em feijão caupi e inoculação em ora-pro-nóbis não apresentaram diferenças estatísticas. Todos os tratamentos foram similares ao controle com nitrogênio mineral, exceto quando inoculado com UFLA0306. Resultados de análises genômicas confirmaram a existência de quatro novas espécies: *Azospirillum itumirinense* (UFLA0325^T), *Azospirillum uflense* (UFLA0267^T), *Azospirillum lavrensis* (UFLA0327^T) e *Pseudomonas ijaciense* (UFLA0306^T).

Palavras-chave: Bactérias associativas. Alimentícia não convencional. Cactácea.

GENERAL ABSTRACT

The ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) is a rustic species that grows well in diverse soils that have not necessarily been fertilized. In addition, the cultivation and consumption of this plant, as well as other non-conventional food plants, contribute to the promotion of food and nutritional security by its value in the preservation and rescue of food culture. Studies with non-conventional food plants also corroborate for their relevance in building and maintaining a healthier and more sustainable food system. Previous studies developed by Vega (2020) and collaborators found that the high protein content of ora-pro-nobis is not related to organic matter or nitrogen content in the soil and were identified the occurrence of associative bacteria of the genus *Azospirillum* predominantly in roots and rhizosphere of the plant. The genus *Azospirillum* represents an important group of associative bacteria that have the ability to promote plant growth. Thus, the objective of the study was to understand the behavior of this plant under water stress and the response of the microbiota associated with ora-pro-nóbis with the help of biological indicators, in addition to testing strains previously isolated (UFLA0261, UFLA0267^T, UFLA0306^T, UFLA0324, UFLA0346 and UFLA0327^T), separately on pumpkin seed, co-inoculated in cowpea (cultivar quarantão) and genomic analysis of some strains previously selected (UFLA0325^T, UFLA0267^T, UFLA0327^T and UFLA0306^T). Microbial parameters, with few exceptions, did not vary between propagation methods and when compared over time. For microbial biomass carbon there were higher values with 14 consecutive days of irrigation suspension in the treatment with plants from seeds and the control irrigated in cuttings. Soil biomass respiration was highest in the control treatment and with 32 days without irrigation for seed propagation. The trials with co-inoculation in cowpea bean and inoculation in pumpkin seedling did not show statistical differences. All treatments were similar to the control with mineral nitrogen, except when inoculated with UFLA0306. Results of genomic analyses confirmed the existence of four new species, for which the names *Azospirillum itumirinense* (UFLA0325^T), *Azospirillum uflense* (UFLA0267^T), *Azospirillum lavrensis* (UFLA0327^T) and *Pseudomonas ijaciense* (UFLA0306^T) were proposed and considered as type strains.

Key-words: Associative bacteria. Unconventional Foods. Cactacea.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ABA – Ácido abscísico

ANI - *Average nucleotide identity*

AP – Altura de Planta

CBM – Carbono da Biomassa Microbiana

CO₂ – Dióxido de Carbono

DC – Diâmetro de caule

DCS - Departamento de Ciência do Solo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

FMA – Fungos Micorrízicos Arbusculares

HCl – Ácido clorídrico

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IAA - Indole-3-ácido acético

KCl – Cloreto de Potássio

KOH – Hidróxido de potássio

LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*

LVdf - Latossolo Vermelho distroférico típico

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MFPA – Massa Fresca da Parte Aérea

MFR – Massa Fresca de Raiz

MPCP - Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas

MSPA – Massa Seca da Parte Aérea

MSR – Massa Seca de Raiz

NASA - National Aeronautics and Space Administration

MLSA - *Multilocus Sequence Analysis*

MST - Massa Seca Total

N - Nitrogênio

NaCl – Cloreto de Sódio

NCBI -National Center for Biotechnology Information

ND - Unidentified

NDVI - Normalized Difference Vegetation Index

$\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ – Citrato trissódico

N_2 – Nitrogênio encontrado no estado gasoso (25 °C e 1 atm)

OPN – Ora-pro-nóbis

PANC – Planta Alimentícia Não-Convencional

PCA - *Principal Component Analysis*

pH - Potencial hidrogeniônico de determinada solução ou mistura.

rRNA – compõem a estrutura do ribossomo

SPAD – Soil Plant Analysis Development

UFLA – Universidade Federal de Lavras

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERENCIAL TEÓRICO	14
Referências	21
ARTIGO I – Ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Mill.) propagada por sementes e estacas sob déficit hídrico e indicadores de qualidade biológica do solo	26
Resumo	26
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados	31
Discussão	36
Conclusões	40
Referências	40
Apêndice A	46
ARTIGO II – Bactérias associativas e promotoras de crescimento coinoculadas em feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) e em ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i>)	52
Resumo	52
Introdução	52
Material e Métodos	54
Resultados	57
Discussão	63
Conclusões	67
Referências	68
Apêndice B	73
ARTIGO III - Descrição e anotação genômica da estirpe <i>Azospirillum itumirinense</i> sp. nov., isolada da rizosfera de <i>Pereskia aculeata</i>	75
Resumo	75
Introdução	75
Material e Métodos	76
Resultados e discussões	80
Descrição da espécie	87
Referências	88
Apêndice C	92
ARTIGO IV - Descrição e anotação genômica de duas estirpes de <i>Azospirillum uflense</i> (UFLA0267 ^T) e <i>Azospirillum lavrensis</i> (UFLA0327 ^T) isoladas da rizosfera de <i>Pereskia aculeata</i> Mill.	96

Resumo	96
Introdução	96
Material e Métodos	97
Resultados e discussão	101
Descrição das espécies	105
Referências	106
Apêndice D	109
ARTIGO V – Descrição e anotação genômica da estirpe <i>Pseudomonas ijaciense</i> sp. nov. (UFLA306 ^T), isolada da rizosfera de ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Mill.)	114
Resumo	114
Introdução	114
Material e Métodos	115
Resultados e discussões	118
Descrição da espécie	122
Referências	123
Apêndice E	127

INTRODUÇÃO GERAL

A ora-pro-nobis (OPN), *Pereskia aculeata* Mill., é uma planta que apresenta rusticidade, uma cactácea de folhas suculentas e verdadeiras, conferida de resistência a seca, pouca ou nenhuma incidência de pragas e doenças, podendo ser muito útil a nós, seres humanos, no que diz respeito ao aporte de proteínas e aminoácidos. Muitos trabalhos com essa planta foram desenvolvidos com a finalidade medicinal, pois apresentam propriedades anestésica (CAMPOS PINTO et al., 2020), antioxidantes (SHARIF et al., 2015), no tratamento de lesões e inflamações da pele. Desenvolve-se muito bem tanto em lugares mais úmidos como na limitação de água e em diferentes tipos de solos.

Tendo em vista o atual cenário climático e os pontos anteriormente mencionados, interferindo principalmente e diretamente na agricultura devido a baixa pluviosidade e aumento da temperatura, se faz importante estudos relacionados a influência de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e o maior aproveitamento de água pelas plantas quando submetidos a um déficit hídrico. Vega et al. (2020) constataram a relação entre OPN e bactérias associativas fixadoras de N₂, o que parece refletir a capacidade da planta de manter altos teores de proteína em suas folhas, se tornando uma boa alternativa nutricional.

Em função das características morfológicas da ora-pro-nóbis, ocorrência e diversidade de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) na rizosfera e raízes (VEGA et al., 2020), se faz necessário estudar essas relações e seu comportamento em relação a promoção de crescimento vegetal e tolerância ao estresse hídrico. Com isso, a proposta desse trabalho foi verificar o potencial biotecnológico de RPCP associadas e isoladas anteriormente da rizosfera e raízes da OPN (VEGA et al., 2020), testá-las separadamente na mesma planta, coincula-las em feijão caupi (cultivar quarentão) e análise genômica de 12 estirpes pre selecionadas do estudo anterior e depositadas na coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo, Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Lavras.

REFERENCIAL TEÓRICO

Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*)

A OPN é uma espécie rústica, nativa da América tropical e sub-tropical (LEUENBERGER, 1986; MORAN e ZIMMERMANN, 1991) que se adapta em solos diversos, que não necessariamente tenham sido adubados. É uma planta não convencional arbustiva de ramos longos, ramificados e perene, comum em Minas Gerais, onde possui uma grande importância ornamental, alimentícia e muito utilizada na medicina popular. É uma

cactácea de porte grande e seu estudo se justifica por vários aspectos. As espécies de *Pereskia* são morfológicamente e anatomicamente semelhantes a uma planta lenhosa 'típica': produzem folhas fotossintéticas, exibem principalmente fotossíntese C_3 e transportam a água do solo diretamente para suas folhas através do xilema secundário (EDWARDS, 2006).



Figura 1. Folhas carnosas (a), fruto (b), sementes (c) da planta de OPN. Créditos: Autor

Suas folhas são simples, de textura carnosa, suculentas na forma de ponta de lanças e quase sésseis. As flores são pequenas, branco-rósea, os ramos são pequenos onde nascem aglomerados dois ou três espinhos longos como agulhas. Frutos globosos, amarelos, do tipo baga, com gloquídeos e sementes pretas (KINUPP, 2014). A densidade estomática é uma das medidas micromorfológicas muito utilizadas na caracterização de plantas. Em OPN, a densidade estomática varia entre 30 e 80 estômatos mm^{-2} de acordo com EGGLI (1984) *apud* LEUENBERGER (1986) e $23,2 \pm 1,9$ estômatos mm^{-2} na epiderme superior e $58,6 \pm 2,9$ estômatos mm^{-2} na epiderme inferior (SAJEVA e MAUSETH, 1991). Em testes feitos em laboratório, Becker (2020) concluíram que a melhor germinação da semente de *Pereskia aculeata* ocorre na faixa de 25-30°C.

A OPN quando sob-baixa precipitação média anual e índice de umidade, condição propicia a estresse, expõem a planta a uma resposta comportamental conservadora estomatal e uma estratégia de enraizamento específica (EHLERINGER, 1993 e STEWART et al., 1995 *apud* EDWARDS, 2006), raso e de raízes longas que permite uma resposta mais rápida às chuvas, além de serem desconectadas do solo em condições de seca por mecanismos semelhantes aos cactos suculentos sem folhas (EDWARDS, 2006). Quando a propagação é por estaquia, alguns fatores podem interferir como a condição fisiológica do tecido ao longo do ramo, o conteúdo de carboidratos e substâncias que promovem e inibem o crescimento,

principalmente quando as estacas são provenientes de diferentes porções do ramo, diferindo quanto ao potencial de enraizamento (DENAXA et al. 2020).

O gênero *Pereskia* é considerado por alguns autores como um modelo de cacto ancestral, descrito como habitante de áreas de floresta tropical seca, mas não sujeita ao estresse hídrico severo (MARTINS et al., 2010). As cactáceas são caracterizadas por terem se adaptado naturalmente em ambientes de seca rigorosa, onde a falta de água é um dos fatores limitantes (PANAGOS et al. 2021), mas algumas não são sujeitas a estresse hídrico severo.

As bactérias endofíticas são bem conhecidas nas plantas cultivadas (JACOB et al. 2020; JHA et al. 2019), mas em grande parte não foram investigadas em plantas silvestres e não convencionais. Em OPN foi relatado recentemente que o alto teor de proteínas pode estar associado a outros mecanismos como interações FBN ou FMAs na melhor utilização dos nutrientes do solo (VEGA et al., 2020), por exemplo.

Feijão Caupi

A demanda por alimentos vem crescendo ano após anos, haja vista que o número populacional é cada vez maior. Logo, há uma necessidade de aperfeiçoar a produção de alimentos para suprir essa demanda, seja pelo aproveitamento maior da área de cultivo e fazendo com que técnicas de aprimoramento sejam cada vez mais difundidas para obtermos uma maior produtividade para suprir a demanda necessária. O Brasil, devido a apresentar variabilidade frente aos fatores abióticos, a agricultura se expandiu adaptando-se em diferentes regiões de grande importância socioeconômica, a exemplo das regiões Norte e Nordeste e se expandindo para a Região Centro-Oeste (ZILLI et al., 2006; FREIRE FILHO et al. 2009 *apud* OLIVEIRA et al. 2015).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma leguminosa de origem africana e uma importante fonte de proteína para milhões de pessoas na África subsaariana e em outras partes do mundo em desenvolvimento (SEBETHA et al., 2015). Possui grande importância socioeconômica na região Norte e Nordeste do Brasil, onde há o predomínio do cultivo de subsistência e, por consequência, conservação de germoplasma ainda pouco conhecido. Segundo feijão mais cultivado no país, é uma leguminosa com alto valor nutritivo e baixo custo de produção. Essa planta é predominante em ambiente de várzeas, pode ser encontrado principalmente em solos classificados como Neossolos Flúvicos e Vertissolos na porção acreana do Rio Juruá, diferente do encontrado no plantio sequeiro e irrigado (OLIVEIRA et al. 2015), são solos geralmente férteis devido à deposição de sedimentos transportados pelas cheias anuais (AMARAL et al. 2013).

A cultura concentra elevada porcentagem do sistema radicular na camada superficial do solo, refletindo-se em alta sensibilidade ao déficit hídrico. Em função disso, o adequado desenvolvimento das plantas está associado à distribuição regular das chuvas ou ao eficiente uso da água de irrigação (CARLESSO et al., 2007). Dentre as principais características desta cultura incluem ainda uma boa qualidade de proteína (23-32%), com alto valor nutricional, boa capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e ser tolerante à seca e as altas temperaturas, além de ter a capacidade de crescer em solos de baixa fertilidade, estabelecendo associações com diversos microorganismos (bactérias do gênero rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares) (CARVALHO et al., 2017).

Déficit hídrico

Atualmente, a população mundial conta com aproximadamente 8 bilhões de indivíduos (ONU, 2022). Diante do crescimento populacional, uma maior produtividade agrícola é cada vez mais exigida. Entretanto, a produtividade crescente pode ser limitada devido às adversidades como: restrições de fertilidade, desertificação, ocorrência de pragas e doenças, mudanças climáticas e, principalmente, limitações hídricas.

O déficit hídrico afeta diversos processos fisiológicos das plantas, geralmente aumentando a resistência estomática, reduzindo a transpiração e, conseqüentemente o suprimento de CO₂ para a realização do processo de fotossíntese, bem como alterando a produção de ácido abscísico (ABA), a abscisão foliar e as características osmóticas das plantas (BANO, AMIST e SINGH, 2019). É um fenômeno complexo e natural que afeta várias regiões do mundo causando impactos negativos na sociedade, na economia e no meio ambiente. O déficit hídrico moderado, geralmente relacionado com a temperatura, tende a reduzir a condutância estomática (gs) antes de reduzir a taxa fotossintética. Assim, é possível que a planta assimile mais moléculas de CO₂ para cada unidade de água transpirada, sendo mais eficiente na utilização da água disponível (TAIZ e ZEIGER, 2002).

A temperatura, associada ao déficit hídrico, também influencia em muitos aspectos nas plantas como o crescimento de raízes e brotações, no rendimento de sementes, na floração e na sensibilidade a pragas (GULL et al., 2020), incluso pela perda por evaporação. Influencia diretamente na velocidade de germinação, aumentando e diminuindo com a temperatura dentro de um intervalo. Souza et al. (2015) afirmam que a rápida germinação da OPN sugere facilidade de formação de suas mudas em temperaturas variadas, aumentando a chance de sobrevivência em comparação com outras espécies que possuem limites de temperatura estreitos nos quais podem germinar.

Além da temperatura, outro aspecto muito importante é a textura do solo, que pode influenciar de forma direta em um mesmo solo em função da quantidade de água presente em determinado momento (QUEIROZ et al., 2015). Os microrganismos do rizomicrobioma podem desempenhar papéis na melhoria da textura do solo, secretando e modulando moléculas extracelulares, hormônios, metabólitos secundários, antibióticos e vários compostos de sinalização, influenciando no crescimento da planta (BACKER et al. 2019). Kisaka et al. (2023) observaram um maior acúmulo de nutrientes em plantas espontâneas ao estudá-las sob condições sem estresse e em solos argilosos, pois fornecem maior área de superfície e retenção de água.

O conceito de estresse é baseado em um princípio físico de Levitt (1980) que até hoje é aplicado para todos os organismos vivos: um corpo é deformado por uma força (estresse). As alterações (deformações) do corpo causado por esta força são chamadas de tensão. Essa deformação ou tensão é primeiramente reversível (força elástica); entretanto, sob uma força intensa, esta deformação torna-se irreversível (força plástica). Por isso, o estresse é a condição ambiental que condiciona um organismo a entrar num estado de tensão, causando-lhe modificações morfofisiológicas que podem levá-lo a sofrer dano (WANG et al., 2020).

A planta pode ser adaptada a uma situação de estresse devido a uma resistência geneticamente determinada, por processo de seleção durante muitas gerações ou ser aclimatada, quando a tolerância é aumentada como consequência de uma exposição anterior ao estresse. Tolerância é o nome dado a essa aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável exercido por um fator externo de influência desvantajosa para a planta (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas - RPCP

Uma demanda global pela sustentabilidade da agricultura promoveu o uso crescente de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) pelos agricultores. Vários trabalhos buscam selecionar microrganismos eficientes na promoção de crescimento, que apresentam a capacidade de se estabelecerem em condições com reduzida disponibilidade hídrica, principalmente oriundos de ambientes semi-áridos (SHARIP et al., 2020; KAVAMURA et al., 2013; ROSAS et al., 2019). Kavamura et al. (2013) obtiveram em um estudo com cactáceas do semiárido brasileiro, um total de 48 bactérias, em sua maioria do gênero *Bacillus* sp., das quais 65% cresceram em meio com reduzida disponibilidade de água. A promoção do crescimento de *Zea mays* L. sob estresse hídrico (30% da capacidade de

campo) foi obtida por duas linhagens de *Bacillus* spp. pelos mesmos autores. Devido ao alto potencial de biodiversidade, o bioma Cerrado possivelmente abriga novos microrganismos com características interessantes e desejáveis, como a capacidade de tolerar algumas condições estressantes do ambiente bem como, para promover o crescimento das plantas.

Além disso, o crescimento vegetal pode também estar relacionado com a produção de fitohormônios (FUKAMI et al.; 2017) e fixação biológica de nitrogênio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), que em conjunto com outras características desses microrganismos promovem o desenvolvimento das plantas e principalmente de suas raízes (MANTELIN e TOIRAINÉ, 2004) e a alteração da arquitetura da raiz por meio de fitohormônios (HASSAN, JOHN, JOSEPH, 2019). Os MPCP têm a capacidade de produzir reguladores de crescimento de plantas como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, óxido nítrico, poliaminas e indole-3-ácido acético (IAA), e pode aumentar a absorção de minerais pelas plantas. As RPCP podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006); aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas (CHHABRA et al., 2019); produção de hormônios como auxinas, citocininas (CAMPOS et al., 2017), giberelinas (SZEKELY-VARGA et al., 2021), etileno (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), uma variedade de outras moléculas, solubilização de fosfato (SATI et al., 2019; RAWAT et al., 2021) e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (LAZZARETTI e MELO, 2005) e tornar as plantas menos susceptíveis aos estresses causados pelo ataque de pragas (LEE DÍAZ et al., 2022).

As bactérias que encontramos na rizosfera podem apresentar uma tolerância às condições extremas às quais estão expostas e ainda conferir certo nível de tolerância às plantas, bem como promover o crescimento dessas. O efeito positivo nas plantas após a inoculação com bactérias foi observado também por Marulanda, Barea e Azcón (2009), visto que as bactérias inoculadas aumentaram a eficiência da planta no uso de água, quando em solos cultivados com limitação hídrica. Dessa forma, uma diversidade de interações mutualísticas com vários grupos de organismos do solo pode garantir a manutenção dos processos do solo (FETZER et al. 2021), pois diferentes microrganismos e suas características relacionadas a respostas de estresse podem ser atenuado, aumentando a probabilidade de alguns indivíduos resistirem à perturbação.

A fixação de nitrogênio foi o mecanismo original proposto pelo qual o *Azospirillum* afeta o crescimento das plantas (DÖBEREINER e DAY, 1976; DÖBEREINER, 1980; HUERGO et al. 2008), mas foi atribuído também a produção de fitohormônios (CASSÁN et

al. 2019). Essas questões são a peça chave nas pesquisas com *Azospirillum*, porque se tivermos uma ideia mais clara de como a bactéria interage com o hospedeiro, podemos prever maneiras de melhorar a interação e assumir que possa haver também interação desse gênero com outras plantas (BASHAN et al., 2020). Algumas espécies ainda podem acumular PHB (poly- β -hidroxibutirato), material armazenado dentro da célula como forma de resistir a períodos de estresse (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Dentre as estirpes da coleção do Departamento de Microbiologia do Solo, isoladas da planta de OPN, o gênero *Azospirillum* predominou nos locais amostrados por Vega et al. (2020), apresentando um possível efeito positivo no crescimento de plantas, haja vista as condições abióticas, nos fazendo questionar sua possível relação associativa com a planta e seu efeito sob condições de escassez hídrica.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, E.F.; ARAÚJO, E.A.; LANI, J.L.; RODRIGUES, T.E.; OLIVEIRA, H.; MELO, A.W.F.; AMARAL, E.F.; SILVA, J.R.T.; NETO, M.A.R.; BARDALES, N.G. (2013) Ocorrência e distribuição das principais classes de solos do estado do Acre. In: Anjos, L.H.C.; Silva, L.M.; Wadt, P.G.S.; Lumbreras, J.F.; Pereira, M.G. (Ed.). **Guia de Campo da IX Reunião Brasileira de Classificação e Correlação de Solos**. Brasília: EMBRAPA, p. 97-129.
- BACKER, J. A. *et al.* (2019) Vaccinating children against influenza increases variability in epidemic size. **Epidemics** 26: 95-103.
- BANO, CHANDA; NIMISHA AMIST; N. B. SINGH (2019) Morphological and Anatomical Modifications of Plants for Environmental Stresses. **Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology**. 29-44. <https://doi.org/10.1002/9781119463665.ch2>
- BECKER, RAFAEL (2020) Polinização e biologia reprodutiva em *Cereus hildmannianus* K. Schum. e *Pereskia aculeata* Mill. (CACTACEAE). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. <http://hdl.handle.net/10183/212083>
- CAMPOS, J.A. *et al.* (2017) Brotação de ora-pro-nóbis em substrato alternativo de casca de arroz carbonizada. **Holos**, Natal, v.7, p.148-167. <http://dx.doi.org/10.15628/holos.2017.6424>
- CAMPOS PINTO N.C. *et al.* (2020) Preclinical studies indicate that INFLATIV, an herbal medicine cream containing *Pereskia aculeata*, presents potential to be marketed as a topical anti-inflammatory agent and as adjuvant in psoriasis therapy, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.72, Issue 12, Pages 1933–1945, <https://doi.org/10.1111/jphp.13357>
- CARLESSO, Reimar *et al.* (2007) Efeito da lâmina de irrigação na senescência foliar do feijoeiro. **Irriga**, v. 12, n. 04, p. 545-556.
- CARVALHO, M.; LINO-NETO, T.; ROSA, E; CARNIDE, V. (2017) Cowpea: a legume crop for a challenging environment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, p. 4273–4284. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8250>
- CASSÁN, F. *et al.* (2020) Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils** 56.4. 461-479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- CHHABRA, D.; POONAM S. (2019) Non rhizobial endophytic bacteria from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) tissues and their antagonistic traits. **Journal of Applied and Natural Science** 11.2: 346-351. <https://doi.org/10.31018/jans.v11i2.2056>
- DENAXA, NIKOLETA-KLEIO; PETER A. ROUSSOS; STAVROS N. V. (2020) Assigning a role to the endogenous phenolic compounds on adventitious root formation of olive stem cuttings. **Journal of Plant Growth Regulation** 39.1. 411-421. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09991-0>

BASHAN, LUZ E. *et al.* (2020) Application of beneficial microorganisms and their effects on soil, plants, and the environment: the scientific legacy of Professor Yoav Bashan. **Biology and Fertility of Soils** 56.4: 439-442. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01466-9>

EDWARDS E. J. (2006) Correlated evolution of stem and leaf hydraulic traits in *Pereskia* (Cactaceae). **New Phytologist**. 172: 479–489. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01850.x>

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. (1976) Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: W. E. Newton and C. J. Nyman (ed.). **Proceedings of the first international symposium on nitrogen fixation**. Wahington State University Press, Pullman. 2:518-538.

DÖBEREINER, J. (1980) Forage grasses and grain crops. In: Bergersen FJ (ed) **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Wiley, New York, pp 535-555.

EKE P. *et al.* (2019) Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Microbiological Research** 228. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126302>

FETZER, JASMIN, *et al.* (2021) Leaching of phosphomonoesterase activities in beech forest soils: consequences for phosphorus forms and mobility. **Frontiers in Forests and Global Change**: 684069. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.684069>

FUKAMI J. *et al.* (2017) Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**. 7:153. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>

GULL, RAZIA, *et al.* (2020) Climate change impact on pulse in India-A review." **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 9.4: 3159-3166.

HASSAN, MOHAMMAD K. *et al.* (2019) The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: A review. **Agriculture** 9.7: 142. <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>

HUERGO, L.F. *et al.* (2008) Regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. In: Cassán, F.D.; Garcia de Salamone, I. *Azospirillum sp.: Fisiologia celular, as interações de plantas e pesquisa agrônômica na Argentina*. Associação Argentina de Microbiologia, Argentina

JACOB, J. *et al.* (2020) Endophytic bacterial strains induced systemic resistance in agriculturally important crop plants. **Microbial Endophytes**. Woodhead Publishing. 75-105. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00004-1>

JHA, YACHANA. (2019) Endophytic bacteria as a modern tool for sustainable crop management under stress. **Biofertilizers for sustainable agriculture and environment**. Springer, Cham. 203-223.

KAVAMURA, V.N. *et al.* (2013) Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*. 168. 183–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>

KINUPP V.F; LORENZI H. (2014) **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas/** Valdely Ferreira Kinupp, Harri Lorenzi. – São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

KISAKA, M. *et al.* (2023) Integrating no-tillage with agroforestry augments soil quality indicators in Kenya's dry-land agroecosystems." *Soil and Tillage Research* 227: 105586. <https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105586>

LAZZARETTI, E; MELO I. S. (2005) Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. EMBRAPA, Jaguariúna, São Paulo.

LEE DÍAZ, A. S. *et al.* (2022) Exploring the volatiles released from roots of wild and domesticated tomato plants under insect attack. *Molecules*, v. 27, n. 5, p. 1612.

LEUENBERGER, B. E. (1986) *Pereskia* (Cactaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 41,1–141

LEVITT, J. (1980) **Response of plants to environmental stress**. II: Water radiation, salt and other stress. New York: Academic Press. 606p.

MANTELIN S; TOURAINÉ B. (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: Impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot.*; 55:27-34.

MARTINS, M. O. *et al.* (2010) Crescimento de plantas jovens de Nim-Indiano (*Azadirachta indica* a. juss.-Meliaceae) sob diferentes regimes hídricos. *Revista Árvore* 34: 771-779. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000500002>

MARULANDA, A.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. (2009) Stimulation of Plant Growth and Drought Tolerance by Native Microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from Dry Environments: Mechanisms Related to Bacterial Effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 28, n. 2, p. 115-124. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9079-6>

MORAN, V. C.; ZIMMERMANN, H. G. (1991) Biological control of cactus weeds of minor importance in South Africa. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 37, p. 37-55.

MOREIRA F.M.S; SIQUEIRA J.O. (2006) **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 1 Ed. Atual E Ampl. Lavras: Ufla.

OLIVEIRA, Eliane de *et al.* Descrição de cultivares locais de feijão-caupi coletados na microrregião Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 45, p. 243-254, 2015.

ONU (2022) População mundial atinge 8 bilhões de pessoas. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2022/11/1805342>. Acessado 14 de janeiro de 2023.

PANAGOS, P. *et al.* (2021) Projections of soil loss by water erosion in Europe by 2050. **Environmental Science e Policy** 124: 380-392. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2021.07.012>

RAWAT, PRATIBHA, *et al.* (2021) Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 21.1: 49-68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>

ROSAS, T. *et al.* (2019) Adjustments and coordination of hydraulic, leaf and stem traits along a water availability gradient. **New Phytologist** 223.2: 632-646. <https://doi.org/10.1111/nph.15684>

SATI, S. C.; PRABHA PANT. (2019) Evaluation of phosphate Solubilization by root endophytic aquatic Hyphomycete Tetracladium setigerum. **Symbiosis** 77.2: 141-145. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0575-y>

SAJEVA M.; MAUSETH J.L. (1991) Leaf-like structure in the photosynthetic, succulent stems of cacti. **Ann. Bot.** 68: 405– 411.

SEBETHA, E. T; MODI, A. T; OWOEYE, L. G. J. Cowpea crude protein as affected by cropping system, site and nitrogen fertilization. *Journal of Agricultural Science*; v. 7, n. 1. p. 224-234. 2015

SHARIF, K. M. *et al.* (2015) Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich extract from *Pereskia bleo*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry** 21: 1314-1322. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.047>

SHARIP, Z.; NORMALIZA N.; FATIMAH M. Y. (2020). Application of an effective microorganism product as a cyanobacterial control and water quality improvement measure in Putrajaya Lake, Malaysia. **Earth Systems and Environment** 4.1: 213-223. <https://doi.org/10.1007/s41748-019-00139-4>

SOUZA R. *et al.* (2015) Genome of *Pseudomonas* sp. FeS53a, a Putative Plant Growth-Promoting Bacterium Associated with Rice Grown in Iron-Stressed Soils. **Genome Announc.** <https://doi.org/10.1128/genomeA.00248-15>.

SZEKELY-VARGA, Z.S.; KENTELKY E.; CANTOR M. (2021) Effect of Gibberellic Acid on the Seed Germination of *Lavandula angustifolia* Mill. **RJH** 2. <https://doi.org/10.51258/RJH.2021.22>

TAIZ, L.; ZEIGER E. (2002) Photosynthesis: physiological and ecological considerations. **Plant Physiol** 9: 172-174.

VEGA C.F. *et al.* (2020) Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Nutrition as Related to Soil Chemical and Physical Attributes and Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00235-9>

WANG, JIA, *et al.* (2020) Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. **International Journal of Molecular Sciences** 21.4: 1446. <https://doi.org/10.3390/ijms21041446>

ZILLI, J.É., DE MORAES CARVALHO, C.P., DE MATOS MACEDO, A.V. et al. (2021) Nodulation of the neotropical genus *Calliandra* by alpha or betaproteobacterial symbionts depends on the biogeographical origins of the host species. **Braz J Microbiol** 52, 2153–2168. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00570-8>

ARTIGO I – Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) propagada por sementes e estacas sob déficit hídrico e indicadores de qualidade biológica do solo

Resumo

A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) é uma cactácea rica em proteínas e com grande potencial de cultivo em regiões em que a água possa se tornar um fator limitante. O objetivo deste estudo foi verificar a tolerância desta espécie à deficiência hídrica e como a biomassa e respiração microbiana do solo são afetadas nestas condições. Cinco tratamentos foram testados: controle irrigado e 7, 14, 21 e 32 dias consecutivos com suspensão da irrigação, em vasos de 3,45 L, em plantas propagadas por sementes e estacas. Observamos um menor valor de potencial matricial (-88,67 kPa) nos tratamentos cultivados com plantas propagadas por estacas em comparação com aquelas cultivadas por sementes (-70,10 kPa). Os parâmetros microbianos, com poucas exceções, não variaram entre os métodos de propagação e quando comparados ao longo do tempo. Para o carbono da biomassa microbiana verificou-se valores mais elevados com 14 dias consecutivos de suspensão da irrigação no tratamento com plantas oriundas de sementes e no controle irrigado em estacas. A respiração da biomassa do solo foi maior no tratamento controle e com 32 dias sem irrigação, para propagação via sementes. Não houve diferença significativa para massa seca de raiz entre tratamentos e mesmo método de propagação.

Palavras-chave: Cactos, Hortaliça não-convencional. Bioindicadores ambientais.

Introdução

Nas últimas décadas têm sido observadas grandes mudanças climáticas, em todo o planeta. No ano de 2021, foi registrado um aumento na temperatura média global de 0,85°C em comparação com a média do período de 1951-1980, segundo cientistas do Instituto Goddard de Estudos Espaciais da NASA (GISS, 2022). Além do impacto causado pela perda de massa das geleiras e aumento no nível do mar, na agricultura as consequências são grandes devido à intensificação de eventos climáticos como estiagens ou secas. Essas circunstâncias resultam diretamente na qualidade das culturas, afetando seu rendimento principalmente em função da diminuição da disponibilidade hídrica, considerando que o potencial matricial é a principal força motriz para o transporte de água das raízes para as folhas (YIN et al., 2021; NEHEMY et al. 2020; ROBBINS e DINNENY, 2015). Portanto, é importante que seja realizado o estudo de diferentes culturas com mecanismos de tolerância a essas condições e com potencial nutritivo similar em relação a outras que exigem condições de maior disponibilidade hídrica.

As cactáceas são caracterizadas por se estabelecerem em ambientes xéricos, ou seja, em que a falta de água é um fator limitante. Dentre as cactáceas relevantes para uso humano, a Ora-pro-nóbis - OPN (*Pereskia aculeata*) é uma cactácea de folhas suculentas e verdadeiras, com pouca ou nenhuma incidência de pragas e doenças, podendo ser muito útil aos seres

humanos, no que diz respeito ao aporte de proteínas e aminoácidos. OPN é uma planta alimentícia não convencional - PANC que apresenta rusticidade, se adaptando bem em solos diversos, que não necessariamente tenham sido adubados (VEGA et al., 2020). É uma planta arbustiva de ramos longos, ramificados e perene, nativa no sul, sudeste e nordeste do país, em especial muito comum em Minas Gerais (KINUPP e LORENZI, 2014), onde possui uma grande importância ornamental, alimentícia e utilizada na medicina popular.

Muitos trabalhos com essa planta foram desenvolvidos com a finalidade medicinal, pois apresentam propriedades que reduzem a percepção e transmissão de estímulos que causam dor (PORTO et al., 2022), antioxidantes (CAMPOS PINTO et al., 2020), alto nível de fibra e quantidades consideráveis de cálcio, magnésio, manganês e zinco, além de vitaminas A, C e ácido fólico nas folhas frescas (TAKEITI et al., 2009), com teor de proteína em torno de 25% na matéria seca (TAKEITI et al., 2009; ALMEIDA e CORREA, 2012; BARBALHO et al., 2016; AMARAL et al., 2019; VEGA et al., 2020).

Queiroz et al. (2015) demonstraram que a OPN não teve sua área foliar afetada e não apresentou queda foliar quando submetida a potenciais de até -70 kPa (-0,07 MPa), porém esse valor não é suficiente para concluir que a planta é tolerante a seca, uma vez que várias espécies apresentam tolerância a faixas maiores (-1,4 a -3,2 MPa), incluindo as plantas de clima tropical (MARÉCHAUX et al., 2015). Edwards (2006) relatou que OPN pode se desenvolver em condições adversas, com escassez de água, que é o principal fator ambiental limitante para o desenvolvimento agrícola em regiões áridas e semiáridas, portanto, é possível que OPN tolere potenciais bem mais reduzidos.

Resultados de pesquisa sugerem que a resposta das plantas ao estresse hídrico pode ser mediada por mudanças na estrutura da comunidade microbiana do solo, induzidas pela menor disponibilidade de água no solo (PAETSCH et al., 2018; NGUMBI e KLOEPPER, 2016; XI et al., 2018). Alguns microrganismos apresentam estratégias de superação do estresse hídrico, fungos e bactérias são capazes de tolerar rápidas mudanças no potencial matricial do solo (MARSCHNER et al., 2002), favorecendo e promovendo o crescimento de plantas (EKE et al., 2019)

Os raros estudos realizados com a tolerância de OPN ao déficit hídrico não são conclusivos, como supracitado. Portanto, é necessário conhecer a eficiência de uso da água pela cactácea e o comportamento da biomassa microbiana do solo sob estresse hídrico. O objetivo deste estudo foi verificar o quão tolerante é esta espécie ao estresse hídrico, quando propagada por estacas ou por sementes, e o comportamento da biomassa e respiração microbiana sob diferentes períodos de suspensão da irrigação.

Material e Métodos

Localização e Implantação

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras, do Departamento de Ciência do Solo, localizado no município de Lavras, Minas Gerais, entre o período de 28 de fevereiro a 3 de junho de 2020. O delineamento experimental foi de blocos inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2x5: dois métodos de propagação (sementes e por estacas), cinco tratamentos de aplicação de irrigação (controle irrigado durante todo o período de condução do experimento e com 7, 14, 21 e 32 dias consecutivos de suspensão da irrigação até o final do experimento) com quatro repetições.

As sementes de OPN foram desinfestadas superficialmente utilizando-se etanol a 70% (1 minuto) e, em seguida, hipoclorito de sódio a 1% (5 minutos). Após a desinfestação, as sementes foram lavadas em água destilada autoclavada por seis vezes, deixadas submergida por 24h e então colocadas em placas de Petri contendo algodão e papel filtro umedecidos e esterelizados. A germinação das sementes foi acompanhada durante o período de sete a quinze dias em estufa BOD sob temperatura de 28°C até a emergência de raiz principal. Após a germinação foram transplantadas para os tubetes (uma semente germinada por tubete).

Para produção de mudas de estaca, porções terminais dos ramos foram coletadas no período vegetativo da planta matriz, limpas, e em seguida cortadas para formar estacas em bisel com tamanho de 15 cm e 5 mm de diâmetro. Para evitar desidratação dos tecidos, elas foram mantidas dentro de um copo com água por 1 dia. Em seguida, a desinfestação superficial foi feita utilizando-se etanol a 70% (1 minuto) e, posteriormente, hipoclorito de sódio a 1% (30 minutos) e lavadas com água destilada seis vezes. As estacas foram inseridas em tubetes (uma estaca por tubete) com um terço coberto por substrato e mantidas em casa de vegetação. As irrigações durante a aclimação foram realizadas a cada três dias com a medida de 40 ml de solução nutritiva completa Hoagland e Arnon (1950) com alta concentração de nitrogênio mineral N^+ (52,5 mg.L⁻¹), com o seguinte composição de soluções de estoque adicionadas a 4 litros de água: 4 ml de 236,16 g.litro⁻¹ CaN₂O₆ 4H₂O; 1 ml de 115,03 g.litro⁻¹ NH₄H₂PO₄; 6 ml de 101,11 g.litro⁻¹ KNO₃; 2,0 ml de 246,9 g.litro⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 1 ml de 10 g.litro⁻¹ FeCl₃; e 1 ml de micronutrientes (2,86 mg.litro⁻¹ H₃BO₃; 2,03 mg.litro⁻¹ MnSO₄ 4H₂O; 0,22 mg.litro⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O; 0,08 mg.litro⁻¹ CuSO₄5H₂O; e 0,09 mg.litro⁻¹ Na₂MoO₄ H₂O), de modo a manter o substrato úmido e suprir as necessidades nutricionais das mudas em condições ótimas de temperatura e água.

O substrato utilizado para produção de mudas a partir de sementes e de estacas foi uma mistura de areia lavada e passada na peneira de 2 mm misturada com vermiculita, na

proporção 1:1, colocado em tubetes de 280 cm³. A formação de mudas de sementes e de estacas nos tubetes ocorreu durante o período de 45 dias, e posteriormente foram transferidas para os recipientes de cultivo definitivo com capacidade de 3,45 litros. Nestes recipientes foi utilizado como substrato um Latossolo Vermelho distroférico típico (LVdf) (CURI et al., 2017), textura muito argilosa (Tab. S1 e S2) coletado no campus da Universidade Federal de Lavras. A distribuição de poros no solo utilizado (Tab. S2) e a curva de retenção de umidade (Fig. S1). O fornecimento de água no experimento foi por capilaridade, ou seja, disponibilizada pela base do vaso e a suspensão hídrica ocorreu por 7, 14, 21 e 32 dias após o período de aclimação por 15 dias, com término do experimento aos 47 dias no tratamento com suspensão hídrica por 32 dias e aos 43 dias nos demais tratamentos após o transplante das plantas (Figura 1):

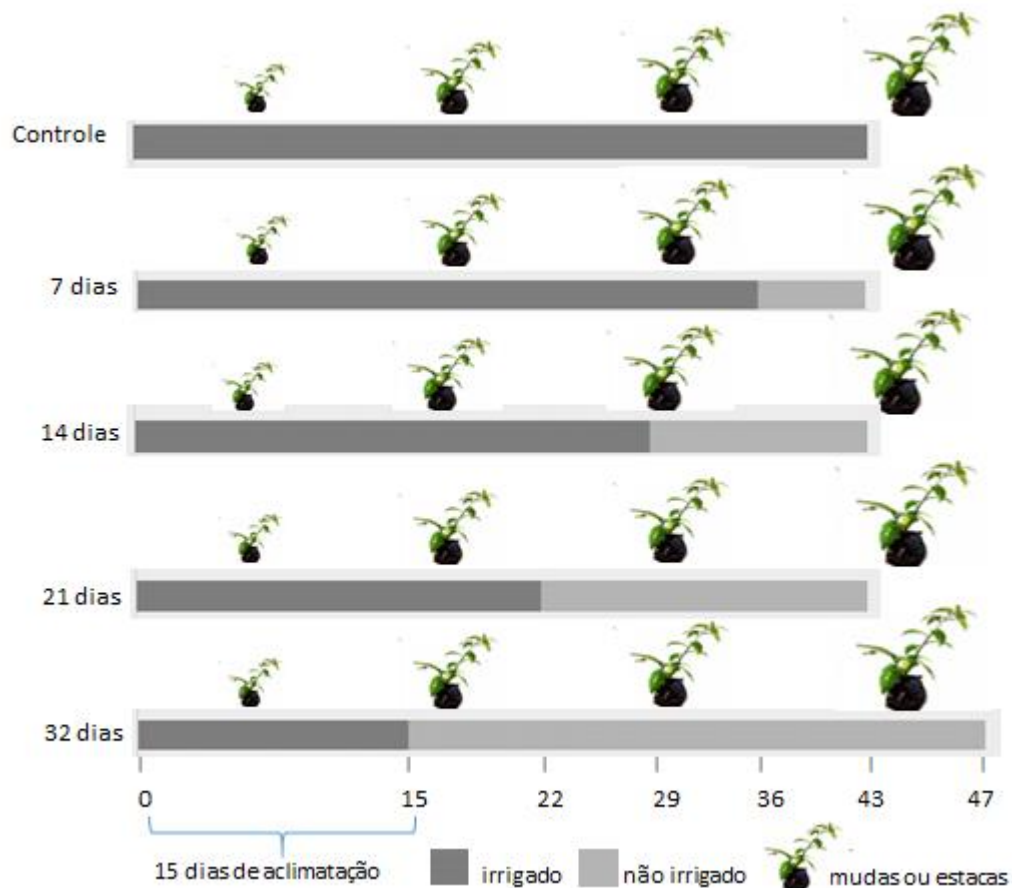


Figura 1 – Distribuição dos tratamentos conforme a disponibilidade hídrica. O eixo X indica o tempo (em dias) de condução do experimento. O eixo Y indica o tratamento (em dias) de suspensão da irrigação.

Parâmetros de avaliação

As avaliações do potencial matricial foliar (Ψ_f), do solo (Ψ_s) e umidade do solo foram feitas a cada quatro dias após implantação do experimento apenas no tratamento com 32 dias de suspensão de irrigação. Nos demais tratamentos as avaliações do potencial matricial foliar (Ψ_f) e do solo (Ψ_s), umidade do solo e NDVI - *Normalized Difference Vegetation Index* (Índice de Vegetação da Diferença Normalizada) utilizando o *greenseeker* foram realizadas ao final do experimento. As amostras foliares e subamostras com 2 g de solo foram coletadas nos vasos do tratamento com maior tempo de suspensão de irrigação, a cada quatro dias, entre 05:00 e 05:30 horas da manhã, para aferição do Ψ_f e do Ψ_s pelo aparelho WP4-T e do NDVI. Para quantificação do Ψ_f foram coletadas uma folha do terço inferior por amostragem, colocadas em sacos plásticos envolto em papel laminado e levados para laboratório sendo preparados discos de 1,2 cm de diâmetro. Para calibração do WP4-T foram utilizadas amostras com solução KCl (0,5M) (DECAGON DEVICES, 2003). A calibração foi feita com 5 avaliações contínuas da mesma solução de KCl (0,5 mol L⁻¹) de potencial conhecido ($\Psi = -2,19$ MPa).

A altura das plantas (AP) (cm) foi medida usando régua graduada, considerando a distância entre o solo e o ápice da planta; o índice SPAD por uma média de cinco leituras; o diâmetro do caule (DC) foi medido usando paquímetro digital no início, após 15 dias e ao final do experimento. Ao final do período experimental foram quantificados: número de folhas total, massa fresca da parte aérea e raiz (MFPA e MFR) (g), e massa seca da parte aérea e raiz (MSPA e MSR) (g) em estufa de circulação de ar forçada durante 3 dias a temperatura de 65°C, massa seca total (MST) (g).

O carbono da biomassa microbiana - CBM foi estimado segundo Vance et al. (1987) e a estimativa da respiração basal microbiana de CO₂ evoluída durante o processo de incubação seguiu o protocolo de Alef (1995). Com os dados de CBM e respiração das respectivas amostras calculamos o quociente metabólico das amostras (ANDERSON e DOMSCH, 1993).

A obtenção das imagens das raízes, distribuídas uniformemente e sem sobreposição em bandejas plásticas de polietileno com fundo contrastante e de tamanho conhecido, foi efetuada com máquina digital semiprofissional à altura do peito. Após a digitalização, as imagens foram corrigidas, alinhadas e analisadas com o software SafiraR[®] (Stonway, Brasil) para estimar as seguintes variáveis radiculares: comprimento radicular (cm), área radicular (mm²) e volume radicular (mm³).

Análise Estatística

Os testes de média dos dados biométricos, incluindo os testes biológicos em triplicata, os medidos com o WP4-T e *Greenseeker* foram realizados à 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott utilizando Sisvar versão 5.7 (FERREIRA, 2019) e testes de correlação de Pearson. Com esse conjunto de dados foi realizada uma Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis – PCA*) no R Versão 1.3.1073 (R Core Team, 2018). A correlação entre os dados biométricos foi feita com o teste de Spearman utilizando o pacote R ‘multtest’, e a visualização foi realizada por *heatmaps* construídos utilizando o pacote ‘corrplot’.

Resultados

O Ψ_s no tratamento com supressão hídrica por até 32 dias atingiu valores médios de -73,52 e -88,76 kPa no tratamento propagado por estaquia determinados aos 28 e 32 dias, respectivamente (Tab. 1). Esses foram estatisticamente menores que as médias de -52,9 kPa e -70,1 kPa encontradas para sementes aos 28 e 32 dias. O Ψ_f em plantas de estacas com 28 (-2,40 MPa) e com 32 dias (-2,8 MPa) de supressão hídrica se diferenciou estatisticamente em relação aos potenciais anteriormente aferidos. Não houve diferença significativa no Ψ_f para sementes. Ao compararmos os meios de propagação, as estacas apresentaram Ψ_f estatisticamente menor em comparação aos tratamentos propagados via sementes com 32 dias de supressão da irrigação. Nesse tratamento, a umidade das amostras de solo apresentou diferenças significativas durante os 12 primeiros dias, tanto para estacas como para sementes, diminuindo progressivamente. A diminuição dos teores da U_g (%) no solo, como esperado, acompanhou a dos valores observados para Ψ_s , em relação ao processo de esgotamento da água disponível do solo.

Tabela 1: Valores médios de potencial matricial do solo (Ψ_s) e foliar (Ψ_f) de *Pereskia aculeata* e umidade gravimétrica do solo obtidos em diferentes períodos de estresse hídrico aplicados para o tratamento com suspensão de irrigação por 32 dias após 15 dias de irrigação contínua.

Tempo sem irrigação a partir de 15 dias com irrigação contínua (dias)	Ψ_s (kPa)				Ψ_f (MPa)				Ug da amostra de solo (%)			
	S		E		S		E		S		E	
0	0	Aa	0	Aa	-1,55	Aa	-2,10	Aa	46,30	Aa	46,40	Aa
4	-0,09	Aa	-0,01	Aa	-1,61	Aa	-1,60	Aa	34,90	Ba	31,30	Ba
8	-9,16	Aa	-10,65	Aa	-1,40	Aa	-1,80	Aa	18,50	Ca	17,80	Ca
12	-23,60	Ba	-23,80	Ba	-1,23	Aa	-1,70	Aa	5,97	Da	6,65	Da
16	-38,20	Ca	-31,89	Ba	-1,64	Aa	-1,50	Aa	1,37	Da	2,18	Da
20	-31,40	Ca	-31,24	Ba	-1,67	Aa	-2,00	Aa	2,84	Da	3,07	Da
24	-43,90	Ca	-37,63	Ba	-2,19	Aa	-1,50	Aa	2,75	Da	3,27	Da
28	-52,89	Da	-73,52	Cb	-2,06	Aa	-2,40	Ba	2,14	Da	2,14	Da
32	-70,09	Ea	-88,67	Db	-1,19	Aa	-2,80	Bb	2,29	Da	2,23	Da

Médias seguidas da mesma letra maiúscula indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos dentro do meio de propagação e minúscula, entre meios de propagação pelo teste de *Scott-Knott* (1974) a 5%. E = Estacas, S = Sementes.

Com 21 e 32 dias de supressão hídrica, houve uma diferença significativa no Ψ_s nos tratamentos propagados por sementes e com 14, 21 e 32 dias para estacas, atingindo valores médios de -70,10 e -88,67 kPa com 32 dias de supressão hídrica, observado para os tratamentos propagados por semente e estaca, respectivamente (Tab. 2). Através da análise do Ψ_f , foram verificadas diferenças com 28 e 32 dias, entre os meios de propagação. Com 21 e 32 dias de supressão hídrica, o potencial foliar (Ψ_f) das estacas apresentou valores significativamente mais negativos. Observamos diferença na umidade das amostras apenas para o controle entre os meios de propagação e não sendo verificadas diferenças significativas entre os tempos de duração do estresse hídrico a partir do décimo quarto dia, tanto para as sementes quanto para as estacas.

Tabela 2: Valores médios de potencial matricial do solo, potencial matricial foliar de *Pereskia aculeata* e umidade gravimétrica do solo com os diferentes tratamentos de períodos de estresse hídrico aplicado ao final do experimento.

Tempo de duração do estresse hídrico (dias)	Potencial no Solo (kPa)				Potencial Foliar (MPa)				Ug da amostra de solo (%)			
	S		E		S		E		S		E	
Controle	-0,69	Aa	-0,37	Aa	-2,25	Ba	-1,91	Aa	33,5	Ab	43,1	Aa
7	-12,92	Aa	-11,4	Aa	-0,75	Aa	-1,49	Aa	17,6	Ba	16,1	Ba
14	-6,54	Aa	-54,51	Bb	-0,6	Aa	-1,44	Aa	8,03	Ca	5,76	Ca
21	-49,63	Ba	-48,27	Ba	-1,72	Ba	-2,91	Bb	5,5	Ca	6,43	Ca
32	-70,09	Ca	-88,67	Cb	-1,59	Ba	-2,84	Bb	10,8	Ca	5,43	Ca

Médias seguidas da mesma letra maiúscula indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos dentro do meio de propagação e minúscula, entre meios de propagação pelo teste de *Scott-Knott* (1974) a 5%. E = Estacas, S = Sementes. Todos os tratamentos tiveram 43 dias de duração, exceto o que teve 32 dias de suspensão hídrica que foi avaliado com 47 dias.

Os valores médios encontrados de NDVI (Tab. 3) diferiram apenas para os tratamentos em que a irrigação foi suprimida por 32 dias, alcançando valores próximos de 0.10 para sementes submetidas a Ψ_s de -70,1 kPa. Resultado semelhante foi observado para o SPAD, demonstrando diferença significativa entre os meios de propagação aos 32 dias, sugerindo menores teores de clorofila na folha das plantas propagadas via semente, o que indica forte impacto metabólico advindo da deficiência hídrica.

Tabela 3: Índice SPAD e NDVI ao final da aplicação dos tratamentos.

Tratamento	SPAD		NDVI (<i>Greenseeker</i>)	
	Sementes	Estacas	Sementes	Estacas
Controle	39,2	44,	0,37	0,
7 dias	2 Aa	76 Aa	Aa	26 Ab
14 dias	42,0	47,	0,41	0,
21 dias	1 Aa	08 Aa	Aa	25 Ab
32 dias	45,7	40,	0,29	0,
	3 Aa	49 Aa	Aa	21 Aa
	47,7	44,	0,27	0,
	0 Aa	62 Aa	Aa	24 Aa
	12,7	26,	0,10	0,
	5 Bb	08 Ba	Ba	12 Ba

Médias seguidas da mesma letra maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott* (1974) a 5%. Todos os tratamentos tiveram 43 dias de duração, exceto o que teve 32 dias de suspensão hídrica que foi avaliado com 47 dias.

O CBM (Figura 2.a) apresentou diferenças entre os meios de propagação aos 14 dias e no Controle, sendo que estes tratamentos de irrigação apresentaram os maiores valores para

propagação via semente e estaca, respectivamente. A respiração microbiana do solo (Fig. 2.b) foi maior no tratamento controle e com 32 dias sem irrigação para propagação via sementes. Esses tratamentos também se destacaram quando comparados com as estacas. Não houve diferenças estatísticas quanto ao qCO_2 e para MSR para todos os tratamentos tanto em sementes como estacas e entre esses métodos de propagação (Fig. 2.c e 2.f).

Para a área superficial e o volume de raízes (Fig. S2 e S3) não foram observadas diferenças entre os cortes de irrigação para cada um dos meios de propagação, apenas entre estes meios (sementes e estacas) com 0, 7 e 21 dias de supressão hídrica (Fig. 2.d. e 2.e).

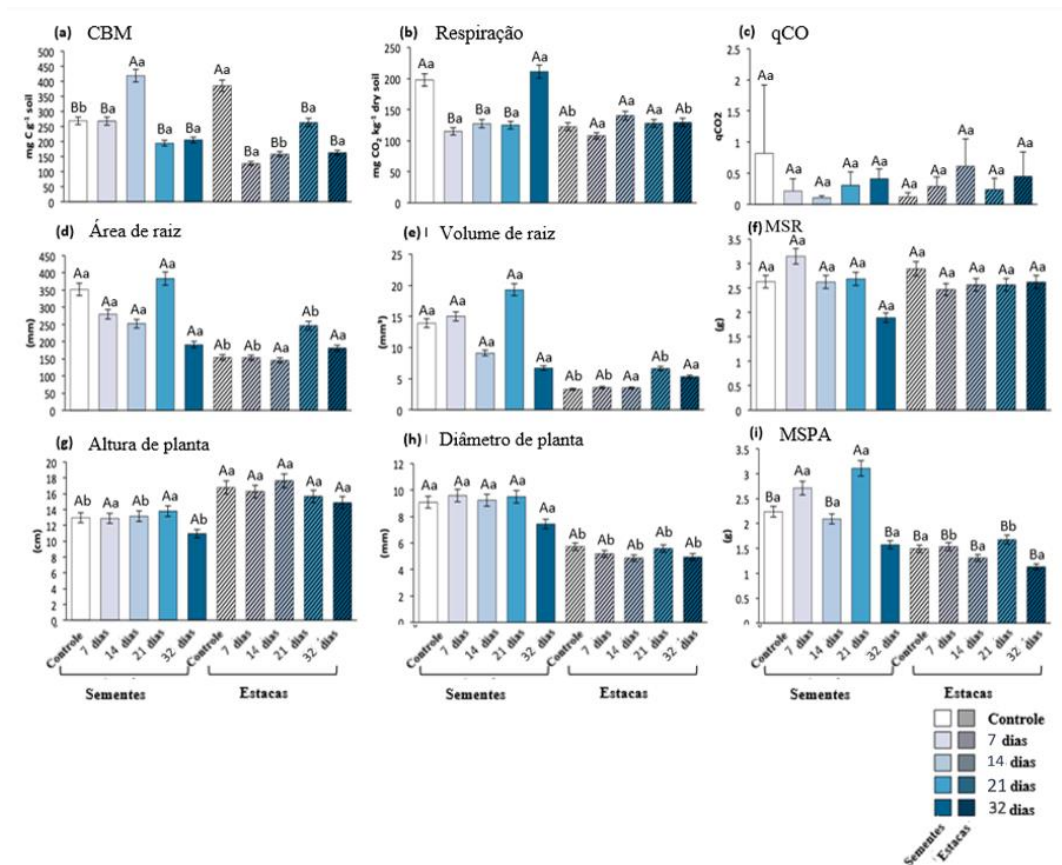


Figura 2: Parâmetros avaliados ao longo do experimento para plantas de *Pereskia aculeata* (sementes e estacas). Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos de irrigação dentro dos meios de propagação e minúsculas, entre meios de propagação.

Não houve diferença dos tratamentos dentro de sementes ou estacas para altura de plantas (Fig. 2.g) ao longo do tempo (Fig. S4), e para plantas oriundas de sementes (Fig. S5) foi observado um maior número de folhas em relação ao método de propagação. O diâmetro (Fig. 2.h) diferiu para todos os tratamentos, quando comparado entre os meios de propagação, sendo os maiores valores verificados para as sementes. A MSPA foi maior nos tratamentos

submetidos a supressão hídrica por 7 e 21 dias nas sementes, e esses tratamentos também se destacaram em comparação a plantas propagadas por estacas. Não foram observadas diferenças estatísticas entre si para plantas oriundas de estacas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a MSPA e MSR, somadas, das plantas mesmo quando submetidas a potenciais matriciais do solo próximos a -70.10 em sementes e -88,67 MPa para estacas. Entretanto, houve menor MFPA em plantas oriundas de sementes, quando submetidas a supressão hídrica por 32 dias.

Foram verificadas diferenças significativas na MFPA para plantas obtidas a partir de sementes com 32 dias de supressão hídrica, sendo estes valores menores quando comparados aos demais tratamentos (Tab. 4). Quando comparado com estacas, os valores foram maiores para sementes e semelhantes apenas na condição de estresse aos 32 dias. Para MSPA, em relação a sementes, foram verificados valores significativamente mais altos com 7 e 21 dias sem irrigação, não sendo observada diferença para as estacas. Quando observamos entre os métodos de propagação, valores maiores em sementes ocorreram com os mesmos tratamentos, 7 e 21 dias de supressão hídrica. Em relação a MFR não houve diferença significativa entre os tratamentos dentro de estacas e de sementes, somente sendo observada diferença na MSR quando se comparou os meios de propagação submetidos a supressão hídrica em de 7 dias.

Tabela 4. Valores de Massa Fresca (MFPA) e Seco (MSPA) da Parte Aérea, Massa Fresca (MFR) e Seca (MSR) de Raiz de *Pereskia aculeata* cultivadas em casa de vegetação.

T ratamen tos (sem água)	MFPA (g planta ⁻¹)		MSPA (g planta ⁻¹)		MFR (g planta ⁻¹)		MSR (g planta ⁻¹)		
	S	E	S	E	E		E		
C	1	5	2	1	2	2	4,	4	
ontrole	1,80 Aa	,88 Ab	,23 Ba	,49 Aa	0,9 Aa	3,59 Aa	87 Aa	,38 Aa	
7	1	6	2	1	2	1	5,	4	
dias	3,33 Aa	,22 Ab	,71 Aa	,53 Ab	2,22 Aa	9,47 Aa	85 Aa	,00 Ab	
1	9	5	2	1	1	1	4,	3	
4 dias	,80 Aa	,01 Ab	,09 Ba	,30 Aa	9,65 Aa	8,05 Aa	71 Aa	,87 Aa	
2	1	6	3	1	2	1	5,	4	
1 dias	0,54 Aa	,21 Ab	,10 Aa	,67 Ab	1,90 Aa	9,37 Aa	79 Aa	,24 Aa	
3	5	3	1	1	1	1	3,	3	
2 dias	,16 Ba	,72 Aa	,57 Ba	,13 Aa	4,22 Ba	8,12 Aa	46 Aa	,75 Aa	

Médias seguidas da mesma letra maiúsculas na coluna e minúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott* (1974) a 5%.

Os resultados da análise de componentes principais (PCA) entre as variáveis biológicas avaliadas durante o experimento explicam 55,2% da variância total (PC1, 35,6% e PC2, 19,6%) (Fig. 3). Os dados de Ψ_f não foram utilizados para essa análise a fim de obtermos resultados mais precisos. Os valores dos vetores seguem em anexo (Tab. S3). Houve

uma clara distinção entre plantas propagadas por sementes em comparação com as obtidas a partir de estacas. As oriundas de sementes (unidades experimentais 1 a 9, 11, 12, 13,15) se correlacionaram bem com variáveis como diâmetro de planta, massa foliar (fresca e seca), *greenseeker* e CBM no quadrante superior direito. O potencial do solo, como esperado, se mostrou inversamente proporcional aos parâmetros referentes à raízes e altura que se correlacionaram entre si e está mais relacionado com os tratamentos de suspensão de irrigação por 32 dias para os dois meios de propagação. Os parâmetros referentes às raízes estão mais correlacionados com parte dos tratamentos propagados por estacas.

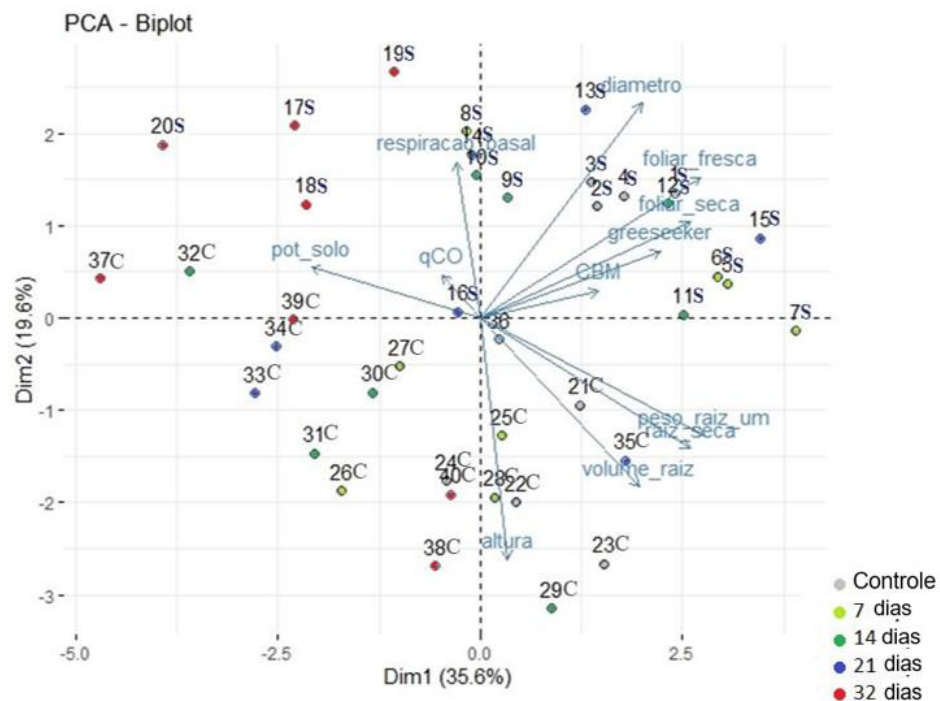


Figura 3. Análise de Componentes Principais (PCA) mostrando a variação dos tratamentos em relação às variáveis analisadas e significativas ($P < 0,05$) em *Pereskia aculeata*. Os vetores ilustram o sinal e a intensidade das relações entre os tratamentos e as variáveis estudadas para plantas provenientes de sementes/seeds (1S – 20S) e estacas/cuttings (21C – 40C).

Discussão

O atributo de um solo com maior influência sobre o Ψ_s é sua textura, e o incremento de argila dos Latossolos influenciou na retenção de água por mais tempo, aumentando a capilaridade e adsorção de água (CARDUCCI et al., 2011). Foi observada uma diferença significativa no Ψ_s aos 14 dias e mais acentuadamente com 32 dias de déficit hídrico. O solo está diretamente relacionado com o comportamento da planta em relação aos tratamentos submetidos e diversidade microbiana (SEATON et al., 2020), por isso se fez relevante a sua

caracterização como argiloso, de boa agregação e porosidade, como descrito por Klein, Reichert e Reinert (2006), em que esses autores confirmam após 48 h de drenagem um potencial matricial de -0,01 kPa. Associações entre a presença microbiana e a fração argila são consistentes com a literatura, em que o teor de argila foi relacionado positivamente com diversidade bacteriana em escalas de campo, regionais e nacionais na Europa (NAVEED et al., 2016).

Nos tratamentos com plantas de sementes foram observados Ψ_s de -52.89 kPa aos 28 dias e -70.09 kPa aos 32 dias, enquanto em estacas os valores de Ψ_s chegaram a -88,67 kPa aos 32 dias, isso por possuírem uma “estratégia de uso ecológico da água”, que mantém um status positivo de água nos tecidos (EDWARDS e DIAZ, 2006) e conservação de energia e carboidratos (SILVA et al. 2017).

Qualquer alteração física no solo pode alterar diretamente sua estrutura e sua atividade biológica (SEATON et al. 2020), como o CBM, podendo também influenciar na produtividade e na resistência do solo à erosão hídrica e degradação ambiental. Observa-se que o CBM nos tratamentos com plantas propagadas por estacas os valores foram similares, apresentando diferença significativa apenas quando saturado (controle), em que foi maior em relação aos demais tratamentos. Semelhante aos resultados encontrados por Gama-Rodrigues et al. (2005) e Silva et al. (2018) que observaram maior CBM em períodos com maior disponibilidade hídrica e valores mais baixos aos 32 dias.

Nos solos tropicais, a disponibilidade de água tem grande influência sobre a dinâmica da microbiota do solo (crescimento) e na produção de CO_2 (respiração), quando associada com o tipo de solo, clima e manejo (BRAGARÍ et al., 2020; SUN et al., 2020). O aumento da respiração no solo, em tratamentos com plantas oriundas de semente e sob irrigação constante (controle), foi similar também aos encontrados por Silva et al. (2018), em que houve maior respiração no período chuvoso, podendo estar associada ao estresse causado pelo excesso de água e menor teor de oxigênio. Observamos também, um aumento da respiração com 32 dias de suspensão, corroborando resultados encontrados por Camelo et al. (2021), que em sistemas agroflorestais, durante a estação seca e consequentemente menor disponibilidade hídrica, apresentam uma situação em que há uma maior respiração basal do solo.

A demanda hídrica de cada espécie vegetal é uma característica própria, emergente de suas características morfofisiológicas genéticas (CHAVES et al. 2002) e das condições do meio em que se encontra. Plantas oriundas de semente apresentaram uma reserva maior de água (diferença entre MFPA e MSPA), no que denominamos hidrênquima, presentes no hipocótilo das plântulas e no córtex do caule de plantas adultas (LINA e ELOISA, 2018). A

planta oriunda de semente, dessa forma, pode ter feito uso dessa reserva acumulada, como estratégia de sobrevivência, observada pela diminuição no diâmetro do caule após serem submetidos à déficits hídricos por um período de 32 dias, e menores Ψ_s , observados para tratamentos com plantas por sementes aos 28 e 32 dias. Dessa forma, as plantas de semente utilizam água armazenada para satisfazer suas demandas hídricas e manter a fotossíntese, se mantendo vistosa por mais tempo após serem submetidas a essa condição, similar a resultados encontrados por Silva et al. (2010) com *Erythrina velutina*.

As plantas que se desenvolvem em condições ambientais estressantes, como as que ocorrem em regiões áridas e semiáridas, para superar a limitação de água e deficiência de nutrientes, muitas vezes impostas pelo solo, apresentam vários mecanismos para lidar com esses fatores adversos (PAES DE MELO et al., 2022). A diferença entre os métodos de propagação, provavelmente, está relacionada a evapotranspiração das plantas, o que pode indicar que mesmo se tratando da mesma espécie, há mecanismos metabólicos diferenciados em relação à superação do estresse hídrico. A partir deste limite sua sobrevivência ao estresse hídrico estará fortemente relacionada ao metabolismo intrínseco da espécie.

Ao perder água, pela respiração foliar, cria-se na folha um déficit que é a força de sucção com que parte da água do solo entra na planta, uma vez que essa força se dá em todo o sistema vascular. Ela depende da temperatura do ar e da umidade relativa. Essa tensão, que chamamos de “potencial matricial foliar”, foi maior em plantas de sementes do que em estacas. As estacas, formadas de material lignificado, possuem o tecido mais resistente e sentem menos com a supressão hídrica, refletindo em valores mais negativos de Ψ_s e Ψ_f ao longo do tempo. Em ambos os casos, propagação via estaca e sementes, as plantas não apresentaram sintomas visíveis de murcha foliar, ou seja, esgotamento hídrico foliar causado por estresse osmótico e redução do crescimento.

O Ψ_f não variou significativamente ao longo dos tratamentos para plantas propagadas por sementes, apenas após 21 dias, o que é muito interessante para a cultura, visto que as folhas são consumíveis. Queiroz et al. (2015) em experimento com ora-pro-nóbis (estacas) observaram que também não houve diferenças no potencial foliar em plantas oriundas de estaca, enquanto em nosso experimento, o Ψ_f variou estatisticamente a partir dos 28 dias de supressão hídrica para estacas e demonstrando valores inferiores ao encontrado para *E. velutina* ($\Psi_f = -0,79$ MPa), uma fabaceae, muito abundante na Caatinga (Leite et al., 2022). O Ψ_f reflete o balanço entre a água perdida pela evapotranspiração e a disponível no solo (BHASKAR, ACKERLY, 2006), mas observa-se que a umidade no solo se manteve alta por um período de 4 dias após suspensão da irrigação sob condições de casa de vegetação e uma

temperatura ambiente de $18,9 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ durante a condução do experimento. Dessa forma, a ora-pro-nóbis apresentou valores bem menores aos encontrados para outras culturas como o milho (*Zea mays*) em que foram observados valores de -0.75 MPa por Veroneze-Júnio et al. (2020); para o feijão (*Phaseolus lunatus* L.) valores de -0,44 MPa por Nascimento et al. (2019), e -0,07 MPa, encontrado por Queiroz et al. (2015) em trabalhos com a mesma cultura, *Pereskia aculeata*.

Apesar das plantas oriundas de sementes terem um maior número de folhas e diâmetro em todos os tratamentos, como esperado, a MFPA reduziu 41,13% e 22,98% para plantas de sementes e estacas respectivamente (Fig. S3) aos 32 dias de supressão, em relação ao controle, assim como observado em outras cactáceas quando submetidas a algum tipo de estresse como diferentes variedades de *Opuntia ficus* (ARBA et al., 2018) e em pitaya (*Stenocereus stellatus*) que apresentou ganhos nos frutos com uma maior disponibilidade hídrica. De forma e visando produtividade foliar, plantas propagadas por estacas são mais interessantes, pois não houve diferença significativa ao longo do tempo. Queiroz et al. (2015), com base na curva de retenção de água do substrato, e médias do potencial matricial entre -0,01 MPa e -0,07 MPa, observaram que a acumulação de massa seca (MSPA) nas folhas (redução de 21,4%) foi menos afetada do que nos caules (redução de 48,1%) e nas raízes (redução de 63,7%).

A baixa disponibilidade hídrica comprometeu também o teor de clorofila na folha, indicado pelo índice SPAD, uma diferença significativa de 67,5% inferior entre plantas (sementes) submetidas a um estresse hídrico de -70,10 MPa aos 32 dias, em relação ao controle, sugerindo menores teores de clorofila na folha, o que indica forte impacto metabólico advindo da deficiência hídrica. Ainda assim, outras espécies de cactáceas apresentam alta taxa de sobrevivência nos primeiros seis meses de privação de água, chegando a oito meses, como é o caso da *A. tetragonus* e *M. curvispinus* (LINA e ELOISA, 2018). Paralelamente as leituras utilizando o *Greenseeker*, refletem valores coerentes com o potencial matricial no solo e suas médias apresentam uma boa correlação de -0,92 e -0,74 para sementes e estacas, demonstrando um grau de correlação inversamente proporcional. Ou seja, quanto maior o estresse hídrico submetido, menor o teor de verde da planta aferido com o SPAD, sendo observadas diferenças significativas aos 32 dias. Em casos prolongados irão resultar em plasmólise e descolamento da membrana plasmática da parede celular, como aponta Lamers et al. (2020), governado por um conjunto de relações gerais entre as propriedades do caule e da folha em *Pereskia* sp. (EDWARDS, 2006).

Sob baixa precipitação média anual e baixo índice de umidade, a planta tende a ficar exposta a um estresse hídrico ou condições desfavoráveis de disponibilidade hídrica. Uma resposta a essa condição é o comportamento conservador estomatal e uma estratégia de enraizamento específica. Um enraizamento raso e de raízes longas que permite uma resposta mais rápida às chuvas, além de serem desconectadas do solo em condições de seca por mecanismos semelhantes aos cactos suculentos sem folhas e caules (EDWARDS e DIAZ, 2006). No caso de experimento em casa de vegetação, as plantas investiram em mais recursos para emissão de raízes com rápido desenvolvimento subterrâneo em direção ao fundo do vaso e uma concentração em maior quantidade no terço inferior do vaso, permitindo o acesso a camadas mais profundas de solo úmido, devido a fonte de água que foi disponibilizada por capilaridade, antes de sofrer um déficit hídrico. A área superficial e volume de raiz foram diferentes entre os meios de propagação e maior para sementes. Essa característica pode ser associada a elevada capacidade invasiva em áreas nas quais essa planta é considerada infestante (HORTON e CLARK, 2001; PATERSON et al. 2011).

Conclusões

A respiração microbiana foi maior nos tratamentos controle e com 32 dias quando propagados por sementes e aos 21 dias e sob irrigação constate quando propagados por estacas.

A ora-pro-nóbis apresentou uma tolerância maior que a já relatada na literatura de -88,67 kPa em relação a -70 kPa, respectivamente, quando propagada por estacas, justificando seu potencial de propagação.

A propagação por sementes demonstrou maior massa seca de parte aérea, o que é muito significativo, uma vez que as folhas são utilizadas como alimento. Essas também apresentaram maiores valores de área e volume de raiz, o que favorece uma maior exploração do solo e aproveitamento de assimilados.

REFERÊNCIAS

- ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds.). **Methods in soil microbiology and biochemistry** New York: Academic, 1995. p. 464-470.
- ALMEIDA E.F.M.; CORRÊA A.D. (2012) Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n.4, p.751-756.
- ANDERSON J.P.E.; DOMSCH K.H. (1993) The metabolic quotient of CO₂ (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition, such as pH, on the microbial of forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7)
- AMARAL T.N. *et al.* (2019) Effects of salts and sucrose on the rheological behavior, thermal stability, and molecular structure of the *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **International Journal of Biological Macromolecules** 131. P. 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.063>
- ARBA M, FALISSE A.; CHOUKR-ALLAH R.; SINDIC M. (2018) Effect of irrigation at critical stages on the phenology of flowering and fruiting of the cactus *Opuntia* spp. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 78, no. 4, pp. 653-660. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.170086>
- BARBALHO S.M. *et al.* (2016) *Pereskia aculeata* Miller Flour: Metabolic Effects and Composition. *Journal of Medicinal Food*, **Journal of Medicinal Food**, Inc., and Korean Society of Food Science and Nutrition. 19 (9) 890–894. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0052>
- BHASKAR R.; ACKERLY D.D. (2006) Ecological relevance of minimum seasonal water potentials. **Physiologia Plantarum** 127: 353–359. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00718.x>
- BRAGARÍ A.C.; MANZONI S.; ROUSK J. (2020) A soil microbial model to analyze decoupled microbial growth and respiration during soil drying and rewetting. **Soil Biology and Biochemistry**. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107871>
- CAMELO D. *et al.* (2021) Soil Microbial Activity and Biomass in Semiarid Agroforestry Systems Integrating Forage Cactus and Tree Legumes. **Agronomy**. 11(8):1558. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081558>
- CAMPOS PINTO N.C. *et al.* (2020) Preclinical studies indicate that INFLATIV, an herbal medicine cream containing *Pereskia aculeata*, presents potential to be marketed as a topical anti-inflammatory agent and as adjuvant in psoriasis therapy, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Volume 72, Issue 12, Pages 1933–1945, <https://doi.org/10.1111/jphp.13357>
- CARDUCCI C.E. *et al.* (2011) Modelagem da curva de retenção de água de Latossolos utilizando a equação duplo van Genuchten. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 77-86.

CHAVES M.M. *et al.* (2002) How plants cope with water stress in field: photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, n. 7, p. 907-916. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf105>

CORE Team, 2018. R: a Language and Environment for Statistical Computing. Retrieved from: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>

CURI N.; SILVA S.H.G.; POGGERE G.C.; MENEZES M.D. (2017) **Mapeamento de solos e magnetismo no Campus da UFLA como traçadores ambientais**. Lavras: Editora UFLA. 148.

DECAGON DEVICES, Inc. (2003) **Operator's manual version 3 WP4 Dewpoint PotentioMeter**. Pullman: Decagon Devices. 77p.

EDWARDS E. J. (2006) Correlated evolution of stem and leaf hydraulic traits in *Pereskia* (Cactaceae). **New Phytologist**. 172: 479–489. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01850.x>

EDWARDS E. J.; DIAZ M. (2006) Ecological physiology of *Pereskia guamacho*, a cactus with leaves. **Plant Cell and Environment** 29:247-256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01417.x>

EKE P. *et al.* (2019) Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Microbiological Research** 228. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126302>

FERREIRA D.F. (2019) Sisvar: A Computer Analysis System To Fixed Effects Split Plot Type Designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>

GAMA-RODRIGUES E.F. *et al.* (2005) Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p. 893-901. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000600007>.

Giss - Goddard Institute for Space Studies (2022) - Disponível em: <https://climate.nasa.gov/vital-signs/global-temperature/> acessado em 20 de julho de 2022.

HOAGLAND D.R.; ARNON D.I. (1950) The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.

HORTON J.L.; CLARK J.L. (2001) Water table decline alters growth and survival of *Salix gooddingii* and *Tamarix chinensis* seedlings. **Forest Ecology and Management** 140, 239–247.

KINUPP V.F.; LORENZI H. (2014) Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas/ Valdely Ferreira Kinupp, Harri Lorenzi. – São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

KLEIN, V.A.; REICHERT J.M.; REINERT D.J. (2006) Água disponível em um Latossolo Vermelho argiloso e murcha fisiológica de culturas. **Revista Brasileira de Engenharia**

Agrícola e Ambiental. v.10, n.3, p.646–650. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662006000300016>

LAMERS J.; VAN DER MEER T.; TESTERINK C. (2020) How plants Sense and respond to stressful environments. **Plant Physiology**, vol. 182, pp. 1624–1635. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.19.01464

LEITE T.S. *et al.* (2022) Ecophysiological and biochemical responses of two tree species from a tropical dry forest to drought stress and recovery. **Journal of Arid Environments** Volume 200, 104720.

LINA A.; ELOISA L. (2018) How do young cacti (seeds and seedlings) from tropical xeric environments cope with extended drought periods? **Journal of Arid Environments**, 154, Pages 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2018.03.009>

MARÉCHAUX I. *et al.* (2015) Drought tolerance as predicted by leaf water potential at turgor loss point varies strongly across species within an Amazonian forest. **Functional Ecology**. Vol 29, Issue 10 p. 1268-1277 <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12452>

MARSCHNER P.; MARINO W.; LIEBEREI R. (2002) Seasonal effects on microorganisms in the rhizosphere of two tropical plants in a polyculture agroforestry system in Central Amazonia, Brazil. **Biology and Fertility of Soils**. 35:68-71. <https://doi.org/10.1007/s00374-001-0435-3>

MOREIRA F.M.S.; SIQUEIRA J.O. (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 1 Ed. Atual E Ampl. Lavras: Ufla.

NASCIMENTO M.G.R. *et al.* (2019) Physiological potential of *Phaseolus lunatus* L. seeds subjected to water stress at different temperatures, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 40, n. 6, suplement 2, p. 2877-2890. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p2877>

NAVEED M. *et al.* (2016) Spatial Variability Of Microbial Richness And Diversity And Relationships With Soil Organic carbon, texture and structure across an agricultural field. **Applied Soil Ecology** 103, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.004>.

NEHEMY M.F. *et al.* (2020) Tree water deficit and dynamic source water partitioning. **Hydrological Processes**, vo. 35, <https://doi.org/10.1002/hyp.14004>

NGUMBI E.; KLOEPPER J. (2016) Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. **Applied Soil Ecology** 105, 109–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>

PAES DE MELO B. *et al.* (2022) Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. **Plants**, 11, 1100. <https://doi.org/10.3390/plants11091100>

PAETSCH L. *et al.* (2018) Effect of in-situ aged and fresh biochar on soil hydraulic conditions and microbial C use under drought conditions. **Scientific reports**, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25039-x>

PATERSON I. D. *et al.* (2011) Biological control of Cactaceae in South Africa. *African Entomology* 19(2): 230–246.

PORTO F.G.S. *et al.* (2022) *Pereskia aculeata* leaves: properties and potentialities for the development of new products, **Natural Product Research**, 36:18, 4821-4832. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2010070>

ROBBINS N.E.; DINNENY J.R. (2015) The divining root: Moisture-driven responses of roots at the micro-and macro-scale. **Journal of Experimental Botany**, 66, 2145–2154. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru496>

QUEIROZ C.R.A.A. *et al.* (2015) Growing *Pereskia Aculeata* Under Intermittent Irrigation According To Levels of matric potential reduction. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 1, p. 1-8. <https://doi.org/10.1590/1983-40632015v4527210>

SEATON F.M. *et al.* (2020) Soil textural heterogeneity impacts bacterial but not fungal diversity. **Soil Biology and Biochemistry** 144 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107766>

SILVA A.O. *et al.* (2018). Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. **Ecological Indicators**, 93, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.073>

SILVA A.P.G. *et al.* (2017) Ripe Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* miller) fruits express high contents of bioactive compounds and antioxidant capacity. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 40, n. 3: (e-749), <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018749>

SILVA E.C. *et al.* (2010) Growth Evaluation and water relations of *Erythrina velutina* seedlings in response to drought stress. **Brazilian Society of Plant Physiology**, 22(4): 225-233.

SUN Y. *et al.* (2020) Drought stress induced increase of fungi: bacteria ratio in a poplar plantation. **Catena**. 193, 104607. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104607>

TAKEITI C.Y. *et al.* (2009) Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller), **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 60:1,148 — 160. <http://dx.doi.org/10.1080/09637480802534509>

VANCE E.D.; BROOKES P.C.; JENKINSON D.S. (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.703-707. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)

VEGA C.F. *et al.* (2020) Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Nutrition as Related to Soil Chemical and Physical Attributes and Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00235-9>

VERONEZE-JÚNIO V. *et al.* (2020) Leaf application of chitosan and physiological evaluation of maize hybrids contrasting for drought tolerance under water restriction. **Brazilian Journal of Biology**. vol. 80, no. 3 pp.631-640. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.218391>

XI N.; CHUA C.; BLOOR J.M.G. (2018) Plant drought resistance is mediated by soil microbial community structure and soil-plant feedbacks in a savanna tree species. **Environmental and Experimental Botany** 155. 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.013>

YIN H. *et al.* (2021) Soil Sensors And Plant Wearables For Smart and Precision Agriculture. **Advanced Materials**. Volume 33, <https://doi.org/10.1002/adma.202007764>

Apêndice A

Tabela S1: Resultado da análise química do Latossolo Vermelho distroférico típico (LVdf) utilizado como substrato no experimento.

A mostras	F		C				B		
	a ²⁺		g ²⁺	l ³⁺	+Al ³⁺				
	-- mg dm ⁻³ --		----- cmolc dm ⁻³ -----						
I	24	0,6	0,3	0,2	0,4	7,3	0,6	1	7,8
II	18	0,3	0,1	0,3	0	2,5	0,5	0,5	2,9
III	84	0,3	0,5	0,2	0	2	0,9	0,9	2,9
Médias	42	0,4	0,3	0,2	0,1	3,9	0,7	0,8	4,5
	pH	M.O.	P-Rem	Zn	Cu	Fe	Mn	V	m
	dag kg ⁻¹		----- mg dm ⁻³ -----				-- % --		
I	4,8	3,7	3	1,1	8,7	52,5	116,2	7	42
II	5,4	1,6	2,4	0,4	4,9	50	13,1	15	0
III	4,8	1,2	2,4	0	0,7	14,6	1,5	32	0
Médias	5	2,2	2,6	0,5	4,8	39	43,6	18	14

SB= Soma de bases, t= CTC efetiva, T= CTC potencial a pH 7,0, M.O.= Matéria orgânica, P-Rem = Fósforo remanescente, V= Saturação por bases da CTC, m= Saturação por alumínio. Fonte: Curi, 2017.

Tabela S2. Análise física do Latossolo (horizontes A e Bw) no campus da Universidade Federal de Lavras.

Atributos físicos	Argila	Silte	Areia	Dp	Ds	VTPcalc	Macro	Micro	DMG	DMP
	---- dag kg ⁻¹ ----			- g cm ⁻³ -	----- cm ³ cm ⁻³ -----			-- μm --		
LV A	62,70	18,55	18,75	2,67	0,92	0,68	0,30	0,37	4,71	4,93
LV Bw	67,09	17,79	15,12	2,97	0,98	0,62	0,20	0,41	4,89	4,96
Diâmetro de poro (μm)										
	>145	143-73	73-50	50-30	30-9	9-2,9	2,9-0,2	<0,2		
LV A	0,208	0,017	0,001	0,011	0,013	0,023	0,031	0,303		
LV Bw	0,152	0,061	0,031	0,031	0,045	0,020	0,015	0,319		

Dp (densidade de partículas) obtidos pelo método do picnômetro; Ds (densidade do solo) obtido pelo anel volumétrico; VTPcalc (volume total de poros calculado), Macro (macroporosidade) e Micro (microporosidade) obtidos pela unidade de sucção; DMG (diâmetro médio geométrico) e DMP (diâmetro médio ponderado), obtidos pelo pré-umedecimento. **Fonte:** Curi, 2017.

Tabela S3. Autos vetores de dados da PCA para os parâmetros mensurados durante o experimento com *Pereskia aculeata* e diferentes regimes hídricos.

	PC1	PC2	PC3	PC4
pot_solo	0.29778704	0.101547	0.509058	-0.20319
foliar_fresca	-0.39542504	0.286208	0.151162	-0.03451
foliar_seca	-0.37563247	0.193892	0.332277	-0.18647

volume_raiz	-0.286357	-0.3724	0.103812	0.20747
altura	-0.04812526	-0.51125	0.047895	0.13678
peso_raiz_um	-0.40020662	-0.25305	0.11785	-0.04873
raiz_seca	-0.37163119	-0.2758	0.097099	-0.07736
CBM	-0.19910958	0.094302	-0.75141	-0.12538
respiracao_basal	0.03657475	0.313091	0.080211	0.797067
diametro	-0.28923231	0.456192	0.012971	-0.22967
greeseeker	-0.32654716	0.122417	0.00158	0.385819
Importance of components:				
	PC1	PC2	PC3	PC4
Standard deviation	2.0644	1.5323	1.02039	0.94206
Proportion of Variance	0.3874	0.2135	0.09465	0.08068
Cumulative Proportion	0.3874	0.6009	0.69552	0.7762
	PC7	PC8	PC9	PC10
Standard deviation	0.65928	0.53805	0.41605	0.25665
Proportion of Variance	0.03951	0.02632	0.01574	0.00599
Cumulative Proportion	0.94829	0.97461	0.99034	0.99633

Figura S1: Curva de retenção de água do Latossolo (horizontes A e Bw) no campus da Universidade Federal de Lavras

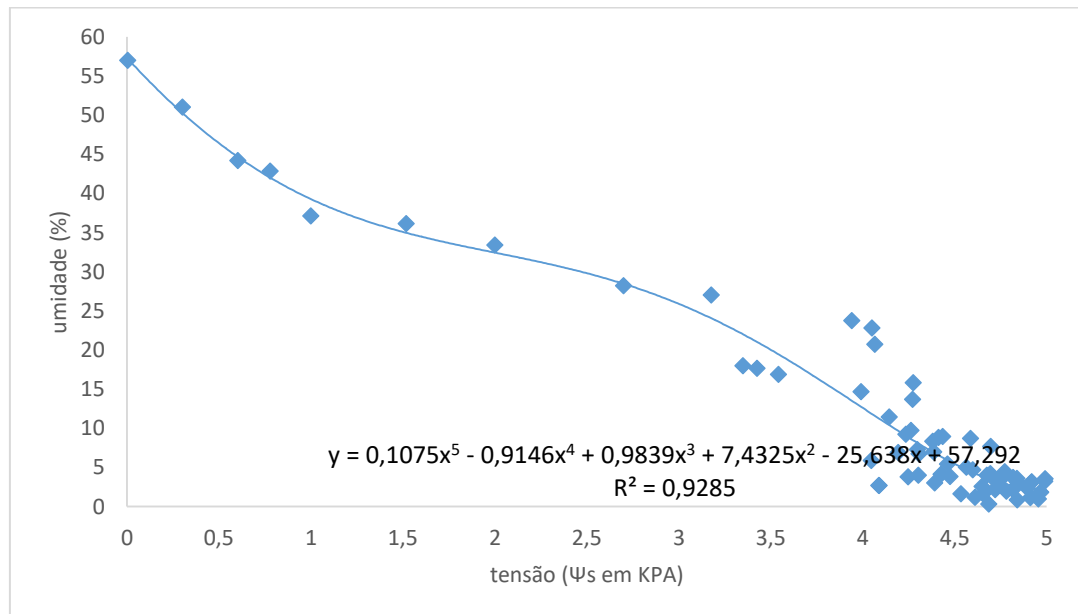
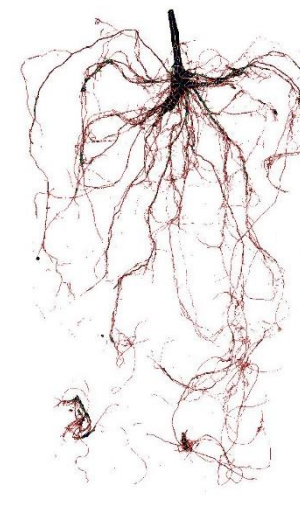
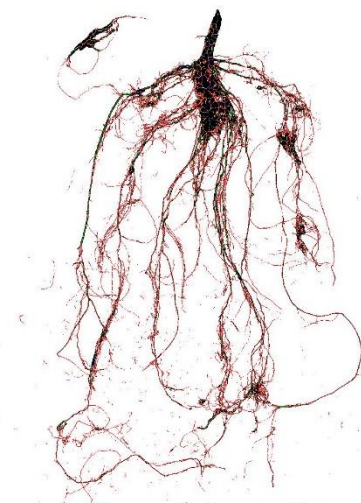
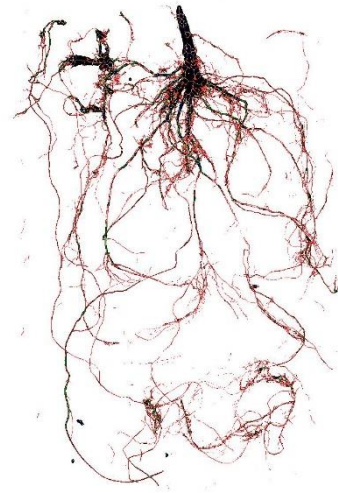
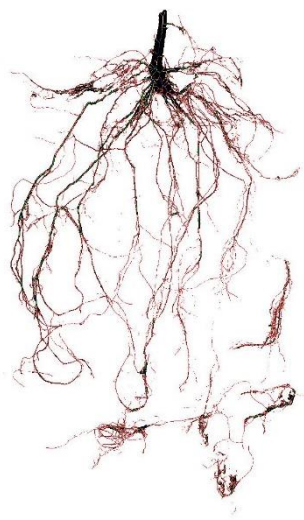
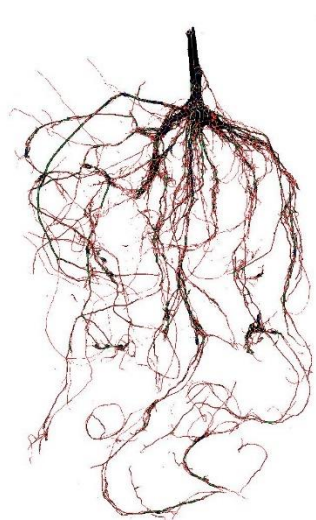


Figura S2. Fotografia das raízes de plantas oriundas de semente de acordo com os respectivos tratamentos. Da esquerda para direita: Controle, tratamento com 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias de estresse hídrico e os respectivos potenciais do solo (MPa), volume (mm³), área (mm²) e comprimento (cm).



Ψ_s	0	- 8,71	-18,85	-54,92	-81,68
Ψ_f	0,47	0,73	1,76	0,98	1,67
Vol.	21012,07	18163,04	14657,72	9259,49	7894,97
Área	25123,39	43280,50	30833,48	28302,05	21507,88
comp.	99,55	102,85	83,76	88,53	72,27

Figura S3. Fotografia das raízes de plantas oriundas de estacas de acordo com os respectivos tratamentos. Da esquerda para direita: Controle, tratamento com 7 dias, 14 dias, 21 dias e 32 dias de estresse hídrico e os respectivos potenciais do solo (MPa), volume (mm³), área (mm²) e comprimento (cm).



Ψ_s	-0,93	-11,62	-28,89	-52,5	-92,75
Ψ_f	1,37	1,65	1,57	4,98	3,6
Vol.	3947,99	4610,69	3641,11	3458,22	4902,24
Área	18354,59	16544,33	16278,85	17415,71	12712,59
Comp.	51,32	99,04	105,30	66,03	120,02

Figura S4. Plantas oriundas de sementes e estacas e submetidas aos tratamentos controle, com 14 dias e 32 dias de supressão de irrigação.

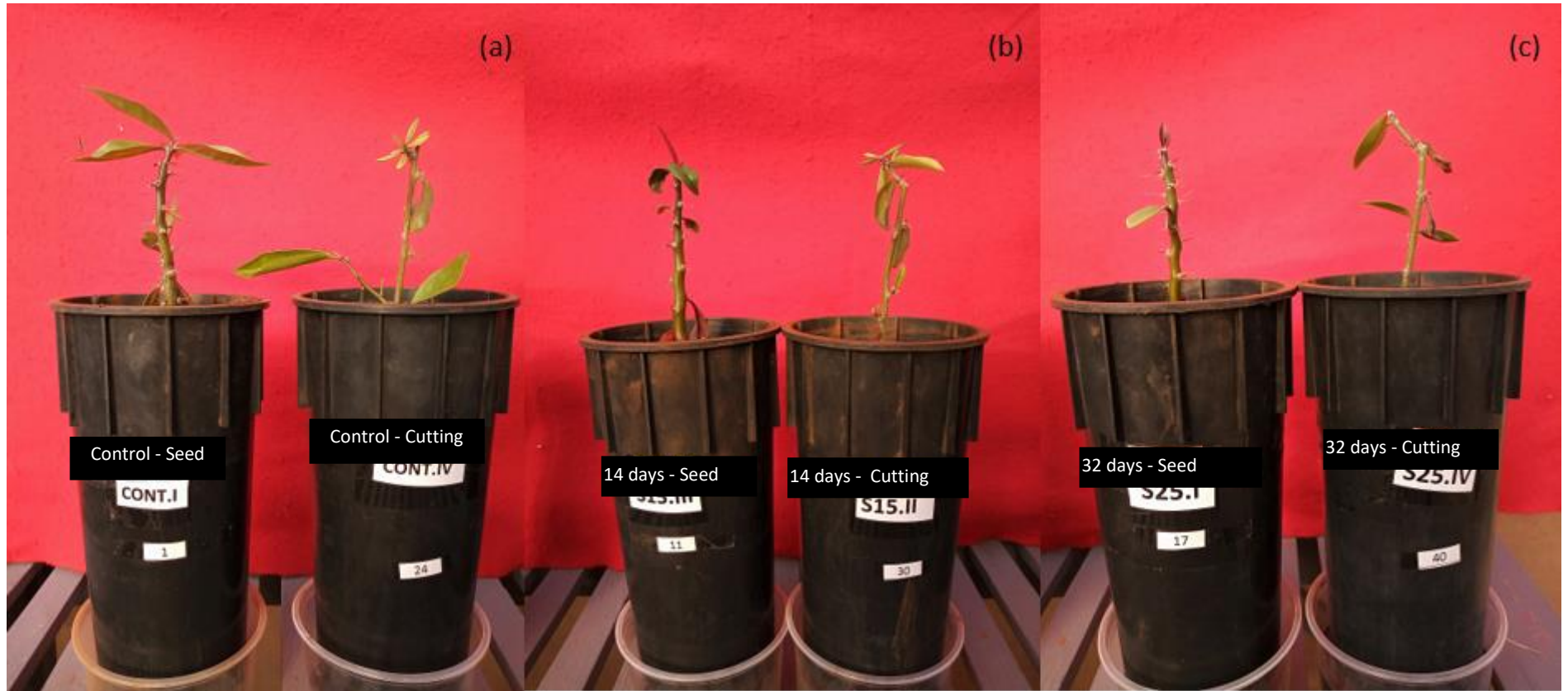


Figura S5. Plantas de Ora-pro-nobis oriundas de estaca e sementes sob irrigação constante ao longo do tempo.



ARTIGO II – Bactérias associativas e promotoras de crescimento coinoculadas em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) e em ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*)

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar se há interação sinérgica entre estirpes associativas isoladas anteriormente de ora-pro-nóbis e rizóbios coinoculadas em feijão caupi e inoculadas em ora-pro-nóbis. Um experimento para cada espécie foi implantado em delineamento experimental em blocos ao acaso, com 11 tratamentos e 4 repetições. Foi mensurada a massa fresca da parte aérea (MFPA) e raiz (MFR); massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR), total (MST); número e massa seca de nódulos (NN e MSN) para feijão-caupi, altura de planta, índice SPAD e eficiência em relação ao tratamento com alta concentração de N mineral (EFCN). O presente estudo demonstrou que a coinoculação com diferentes estirpes associativas separadamente não interferiram na formação da massa seca da parte aérea e raiz do feijão-caupi. As estirpes isoladas previamente de OPN, embora apresentem fixação biológica de nitrogênio de forma associativa em trabalhos anteriores, não apresentaram resultados esperados no ensaio com OPN significativamente.

Palavras-chave: Fixação biológica de N₂. *Azospirillum*. Promoção de crescimento.

Introdução

Para atender o consumo de alimentos que aumenta com o crescimento exponencial da população, é necessário procurar por formas de se expandir a produção, sem elevar seus custos e minimizando impactos ambientais. Investimento em “tecnologias limpas”, ou seja, que sejam capazes de reduzir desperdícios e prejuízos ao meio ambiente, são práticas necessárias para atingir esse desafio. A redução ou substituição do adubo nitrogenado pela inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (BFN) que nodulam leguminosas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006) é uma delas. Essas bactérias geralmente são multifuncionais e também podem contribuir para a promoção de crescimento vegetal por outros processos (SILVA et al., 2022).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) conhecido popularmente como feijão-de-corda, feijão de praia ou fradinho é uma leguminosa de grande importância socioeconômica no Norte e Nordeste do Brasil e cultivada na África há mais de 2 mil anos na agricultura tradicional (KINUPP, 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Apresenta boa tolerância às altas temperaturas e ao estresse hídrico, além de possuir altos teores de proteínas, carboidratos, fibras, minerais e pouco teor de lipídeos, sendo uma importante

fonte de proteína vegetal, de baixo custo, tornando uma alternativa para a alimentação humana (FROTA et al., 2008).

Entretanto, a deficiência de nutrientes no solo, sua disponibilidade e o baixo teor de matéria orgânica podem comprometer o bom desenvolvimento da planta e por isso se faz importante a utilização de tecnologias para sanar a baixa fertilidade do solo, por exemplo. Aplicação de cepas eficazes de rizóbio como biofertilizantes para melhorar a produção de leguminosas é uma abordagem importante na agricultura sustentável, pois contribui para a redução da adubação mineral. Os fertilizantes nitrogenados são caros e responsáveis por altas emissões de gases de efeito estufa (GEEs) durante sua produção e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) representa uma alternativa ambiental e economicamente viável garantindo a preservação do ecossistema e melhoria na qualidade do solo (LENGWATI, MATHEWS e DAKORA, 2020).

Trabalhos desenvolvidos anteriormente indicam melhor rendimento, saúde da planta e nodulação das leguminosas quando coinoculadas com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), em comparação com a inoculação apenas com rizóbio (BARBOSA et al. 2021; NAOE et al. 2020). Isso se torna ainda mais importante quando se fala de solos da zona tropical que são, em geral, pobres em nitrogênio, requerendo suprimento nutricional desse elemento para obtenção de maiores produtividades. Além disso, a coinoculação desses microrganismos pode mitigar os efeitos do estresse hídrico nas plantas (STEINER et al. 2020; BARBOSA et al. 2021).

Por outro lado, a fixação ocorre também por diazotróficos de vida livre, como as bactérias do gênero *Azospirillum* que estimulam o crescimento de plantas não leguminosas. *Azospirillum brasilense* Ab-V5 já é oficialmente recomendada para produção de inoculantes para arroz, milho, trigo e braquiária no Brasil (HUNGRIA et al., 2016). Além disso, *Azospirillum* é um gênero comumente usado como inoculante, devido à sua versatilidade quanto à fixação de nitrogênio, produção de hormônio e solubilização de fosfato (BASHAN, HOLGUIN, DE-BASHAN, 2004; HOSSAIN et al., 2015).

Na busca por menores gastos com insumos e impactos ambientais a coinoculação de *Bradyrhizobium* com bactérias associativas do gênero *Azospirillum* merecem atenção a fim de encontrarmos novas técnicas para aumentar e aperfeiçoar a eficiência na utilização de nitrogênio pela planta. Askar et al. (2020), Vega et al. (2020), Bonatelli et al. (2021) relatam associações que podem ocorrer entre bactérias e cactos, favorecendo as plantas quanto ao estresse abiótico, nos quais, e com base nessas

informações, podemos supor que pode haver interações sinérgicas entre essas estirpes associativas e o feijão caupi quando coinoculadas.

Estudos anteriores desenvolvidos por VEGA et al. (2020) constataram que o alto teor de proteína nas folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) não está relacionado com a matéria orgânica ou teor de N no solo. Além disso, foi demonstrada a ocorrência e diversidade de RPCP nas raízes de ora-pro-nóbis, em que *Azospirillum* foi o gênero de bactéria diazotrófica predominante nas raízes e na rizosfera de ora-pro-nóbis, nos fazendo questionar sobre a promoção de crescimento de OPN por FBN quando em associação com RPCP.

Embora pertença à família Cactácea, a ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* M.) apresenta folhas verdadeiras (GARCIA et al., 2019) e possui elevado conteúdo de proteínas em sua massa seca (22,9% a 28,6% w/w) (FARIA et al., 2019; MERCÊ et al., 2001; VEGA et al., 2020) se comparados à abóbora com 4,75% (HASHASH et al., 2017) e espinafre com 19,10% de proteína (KAVITHA et al., 2013) e dentro da faixa encontrada para leguminosas, que pode variar de 17% em feijões até 45% na soja (MAPHOSA e JIDEANI, 2017). O alto teor de proteína das leguminosas é atribuído à sua simbiose com a atividade das bactérias fixadoras de nitrogênio em suas raízes, além de compostos antioxidantes (RIBEIRO et al., 2021), constituindo-se em uma alternativa para melhoria da qualidade e da segurança alimentar.

A inoculação de microrganismos é uma prática comum na agricultura e muito bem embasada, todavia quando em conjunto com outras rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCB), a co-inoculação, como é conhecida, são relatados efeitos positivos à planta e na fixação biológica (FERREIRA et al., 2018; OLIVEIRA LONGATTI et al., 2013). Nesse sentido, os objetivos do trabalho foram: Verificar a promoção de crescimento do feijão-caupi, cultivar “Quarentão” e a eficiência simbiótica pela coinoculação da estirpe UFLA0384 (*Bradyrhizobium viridifuturi* sv *tropici*) com estirpes associativas anteriormente isoladas de *Pereskia aculeata*; e testá-las separadamente como fixadores de N₂ em OPN.

Material e Métodos

Dois ensaios foram conduzidos em delineamento experimental de blocos ao acaso em casa de vegetação e condições axênicas, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. O ensaio I com feijão caupi (cultivar Quarentão) foi implantado no dia 30 de maio de 2021 e os tratamentos foram: T1 – sem inoculação e

com alta concentração de N mineral (52.5 mg.L⁻¹); T2 - sem inoculação e baixa concentração de N (5.25 mg.L⁻¹); T3 - inoculado com a UFLA0384 (*Bradyrhizobium viridifuturi* sv *tropici*) atualmente autorizada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como um dos inoculante para feijão-caupi; T4 – UFLA0261 (*Bacillus safensis*) + UFLA0384; T5 – UFLA0267 (*Azospirillum brasiliense*) + UFLA0384; T6 - UFLA0306 (*Pseudomonas* sp.) + UFLA0384; T7 - UFLA324 (*Azohydromonas australica*) + UFLA0384; T8 – UFLA0346 (*Azospirillum* sp.) + UFLA0384; T9 – UFLA0327 (*Azospirillum brasiliense*) + UFLA0384; T10 - UFLA1086 (*Dyella* sp.) + UFLA0384 e T11 - MIX composto pelas estirpes UFLA261, UFLA0267, UFLA0306, UFLA0324, UFLA 346 e UFLA 327, que foram previamente isoladas de raízes de plantas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) como descrito por Vega et al. (2020). O ensaio II foi implantado no dia 05 de julho de 2021 e testados em ora-pro-nóbis os seguintes com os mesmos tratamentos sem a UFLA0384. Cada ensaio totalizou 11 tratamentos com quatro repetições, totalizando 44 unidades amostrais.

Tabela 1. Origem (local e ambiente de onde foi isolada), grupo fenotípico das estirpes diazotróficas que foram utilizadas no trabalho. (COSTA et al. 2019; VEGA et al. 2020)

Estirpes	Local	Ambiente	Grupo fenotípico	Identificação	Número de acesso	
0384	UFLA Rondônia	Roraima	Pastagem	- <i>tropici</i>	<i>B. viridifuturi</i> sv 28953v1	ASM2
0261	UFLA Ijacuí	Ijacuí	<i>P. aculeata</i>	LPAO	<i>Bacillus safensis</i> 4924	HQ28
0267	UFLA Ijacuí	Ijacuí	<i>P. aculeata</i>	CMGB	<i>A. brasiliense</i> 6404	KP67
0306	UFLA Ijacuí	Ijacuí	<i>P. aculeata</i>	CMGB sp.	<i>Pseudomonas</i> 7736	KF31
0325	UFLA Itumirim	Itumirim	<i>P. aculeata</i>	CMGB	<i>A. agricola</i> 48768	NR_1
0346	UFLA Ijacuí	Ijacuí	<i>P. aculeata</i>	LPSO	<i>Azospirillum</i> sp. 2383	AB54
0324	UFLA Ijacuí	Ijacuí	<i>P. aculeata</i>	UESO	<i>Azohydromonas australica</i> 41243	NR_0
0327	UFLA Ijacuí	Ijacuí	<i>P. aculeata</i>	CPAO	<i>A. brasiliense</i> 6403	KP67
1086*	UFLA Miguelão	Miguelão	<i>Anadenanthera colubrina</i>	LIMB	<i>Dyella</i> sp. 3884	JX17

LPAO (lente, pouca, aquosa e opaco); CMGB (convexa, moderada, gomosa e brilhante); CPAO (convexa, pouca, abundante e opaco); UESO (umbilicada, escassa, seca e opaco). *Cresc. Rápido; pH neutro/alcalino; LIMB (lente; irregular; EPS moderado; creme brilhante e consist. massa butírica).

As sementes em ambos os experimentos foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% (30s), peróxido de hidrogênio 3% por 3 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada estéril. Os tubetes com capacidade de 250 mL de substrato e previamente lavados com hipoclorito de sódio a 2,5%, foram autoclavados 2 vezes, entre 24 horas, à pressão de $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$, a 121°C e por 40 minutos com uma mistura de areia e vermiculita (1:1). Após a emissão da radícula, as sementes germinadas de ambas as espécies e de tamanho uniforme foram transferidas para os tubetes.

Para preparo dos inoculantes, colônias isoladas das estirpes bacterianas (com exceção da UFLA0384 e *Dyella*) foram crescidas em meio de cultura líquido Nfb (DÖBEREINER et al., 1995) reduzido o ácido málico para $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e acrescido a mesma quantidade de manitol e sacarose (MAGALHÃES, 1981) e a estirpe UFLA0384 crescida em meio YM líquido, mantidos por 24 horas sob agitação de 110 rpm, a 28°C . *Bradyrhizobium* cresceu em 72 horas. As bactérias foram separadas do meio líquido por centrifugação (5 min - 2.200 rpm) e ressuspendidas em 40 mL de solução salina 0,9%. As plantas, nos respectivos tubetes foram inoculadas com 1 mL de solução com a bactéria referente a cada tratamento. Para os tratamentos coinoculados foi utilizado 1 mL de solução com ambas as estirpes na proporção 1:1 (v/v) e para o MIX utilizamos 1 mL de solução contendo todas as estirpes.

As plantas receberam solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1938) a cada três dias, mantendo-se o substrato a 60% da capacidade máxima de retenção (previamente determinada) através da pesagem do substrato. A solução com adição de alta concentração de nitrogênio mineral N+ ($52,5 \text{ mg.L}^{-1}$), aplicada no tratamento T1, com o seguinte composição de soluções de estoque adicionadas a 4 litros de água: 4 ml de $236,16 \text{ g.litro}^{-1} \text{ CaN}_2\text{O}_6\text{4H}_2\text{O}$; 1 ml de $115,03 \text{ g.litro}^{-1} \text{ NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 6 ml de $101,11 \text{ g.litro}^{-1} \text{ KNO}_3$; 2,0 ml de $246,9 \text{ g.litro}^{-1} \text{ MgSO}_4 \text{ 7H}_2\text{O}$; 1 ml de $10 \text{ g.litro}^{-1} \text{ FeCl}_3$; e 1 ml de micronutrientes ($2,86 \text{ mg.litro}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$; $2,03 \text{ mg.litro}^{-1} \text{ MnSO}_4 \text{ 4H}_2\text{O}$; $0,22 \text{ mg.litro}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \text{ 7H}_2\text{O}$; $0,08 \text{ mg.litro}^{-1} \text{ CuSO}_4\text{5H}_2\text{O}$; e $0,09 \text{ mg.litro}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \text{ H}_2\text{O}$), e um com baixa concentração de mineral nitrogênio N- ($5,25 \text{ mg.L}^{-1}$), aplicado no tratamento T2, com a seguinte composição de soluções de estoque adicionada a 4 litros de água: 0,4 ml

de 236,16 g.litro⁻¹ CaN₂O₆ 4H₂O; 0,1 ml de 115,03 g.litro⁻¹NH₄H₂PO₄; 0,6 ml de 101,11 g.litro⁻¹ KNO₃; 2,0 ml de 246,9 g.litro⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 3,0 ml de 87,13 g.litro⁻¹K₂SO₄; 10 ml de 12,6 g.litro⁻¹ CaH₄P₂O₈ - H₂O; 200 ml de 1,72 g.litro⁻¹ CaSO₄ 2H₂O; 1 ml de 10 g.litro⁻¹ FeCl₃; e 1 ml de micronutrientes.

As plantas de feijão caupi foram coletadas aos 74 dias e a ora-pro-nobis, com 66 idias, após a semeadura, para a avaliação da massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR); massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST); número e massa seca de nódulos (NN e MSN) para feijão-caupi, altura de planta, índice SPAD (índice que avalia o desempenho fotossintético da planta utilizando clorofilômetro 502 plus) e eficiência em relação ao tratamento com alta concentração de N mineral (EFCN). Para a determinação da MSPA e da MSR, a parte aérea e as raízes foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, até atingirem peso constante. A eficiência relativa de cada tratamento calculada pela seguinte fórmula:

$$EFCN = \frac{MSPA_{tratamento} * 100}{MSPA}$$

Onde, MSPA no denominador é do tratamento com alta concentração de N mineral.

Imagens das raízes foram obtidas, distribuídas uniformemente, sem sobreposição, em bandejas plásticas de polietileno com fundo contrastante e de tamanho conhecido, com máquina digital semiprofissional a altura do peito. Após a digitalização, as imagens foram corrigidas, alinhadas e analisadas com o software SafiraR® (Stonway, Brasil) com limiarização manual de 130 pontos, aproximadamente, para estimar as seguintes variáveis radiculares: comprimento radicular (cm), área radicular (mm²) e volume radicular (mm³). Os dados foram submetidos a análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste *Scott-knott* a 5% de probabilidade, utilizando o Software R version 4.0.5.

Resultados

Os resultados obtidos referentes às médias de MFPA, MSPA, MSR, EFCN e número de nódulos no primeiro ensaio, com feijão caupi, estão representados na tabela 2. Para essas variáveis analisadas não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 2. Valores médios de massa seca da parte aérea (MSPA), da massa seca da raiz (MSR), Eficiência em relação ao tratamento com alta concentração de N mineral (EFCN) e número de nódulos em função dos tratamentos testados em feijão caupi “Quarentão” em condições axênicas 60 dias após plantio de sementes pré-germinadas.

Tratamento	MSPA (g)	MSR (g)	EFCN	Nº de nódulos
1. Trat. com N	0,63 7	0. 325	100.00	t
2. Trat. sem N	0,48 1	0. 295	85.49	t
3. U0384	0,57 9	0. 300	91.58	ε
4. U0261+0384	0,63 3	0. 327	99.70	ε
5. U0267+0384	0,60 8	0. 313	95.07	ε
6. U0306+0384	0,49 0	0. 283	75.99	ε
7. U0324+0384	0,64 6	0. 287	103.84	ε
8. U0346+0384	0,57 0	0. 327	90.08	ε
9. U0327+0384	0,62 8	0. 383	101.04	ε
10. U1086+0384	0,60 0	0. 342	92.90	ε
11. MIX- OPN	0,62 7	0. 277	97.64	ε

CV: 0,00. Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de *Scott-knott* a 5% de significância.

Por sua vez, foram observados valores maiores de SPAD para o tratamento com nitrogênio mineral, uma média de 66,69 seguido dos tratamentos coinoculados com UFLA0306+0384 e UFLA0261+0384. O tratamento que apresentou menor SPAD foi o coinoculado com UFLA0346+0384 e os demais se mantiveram com valores médios. As *médias de SPAD* dos tratamentos diferem entre o tratamento com N mineral e demais tratamentos coinoculados e o tratamento sem N mineral e sem inoculação.

Não foi observada nodulação nos tratamentos com alta e baixa concentração de N mineral, evidenciando as condições axênicas do experimento conduzido em casa de vegetação. A MFN e altura se comportaram da mesma forma, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos, exceto quando coinoculado com U0306+0384 (Fig. 1).

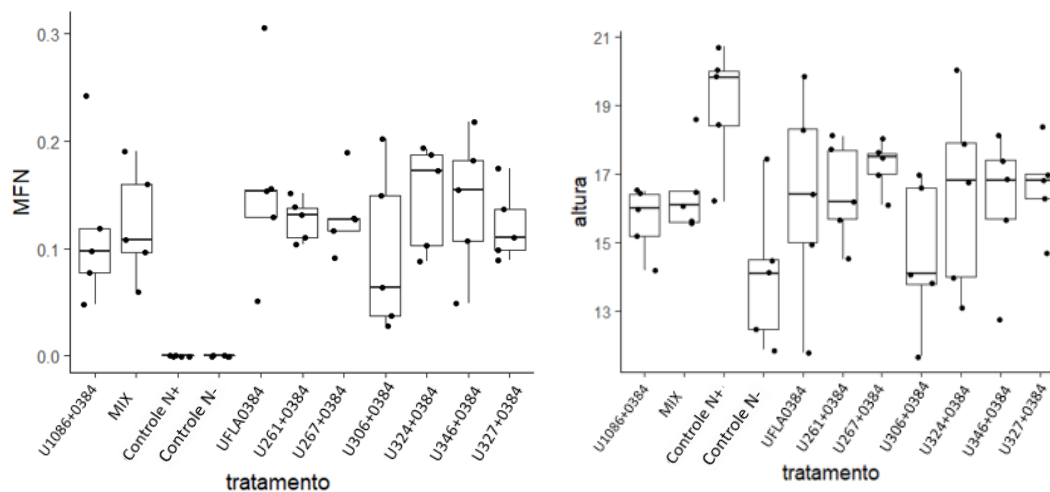


Figura 1. Valores médios de Massa Fresca de Nódulos (MFN) e altura em função dos tratamentos testados em feijão caupi, cultivar Quarentão, sob condições axênicas e casa de vegetação. Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si sob as mesmas condições de experimento.

Os resultados da análise de componentes principal (PCA) (Fig. 2) entre as variáveis biológicas para os tratamentos avaliados durante o experimento explicam 53,4% da variância total (PC1, 31,2% e PC2, 22,2%). Os valores dos vetores seguem em anexo (Tabela S1).

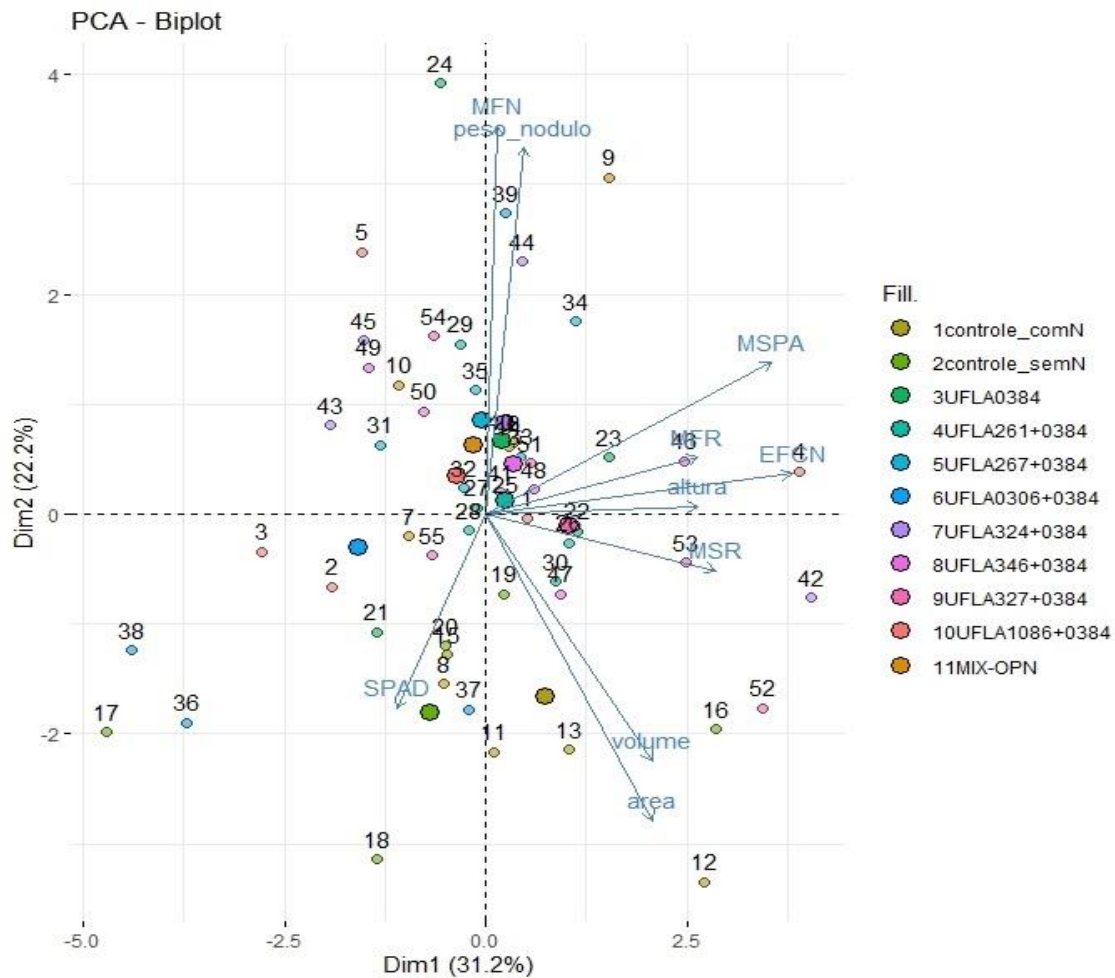


Figura 2. Componentes principais (PC1 e PC2) dos resultados avaliados e características morfológicas da planta de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). T1- Alta concentração de N mineral (1 a 5); T2 - Sem inoculação e baixa concentração de N (6 a 10); T3 - *B. viridifuturi* sv *tropici* (11 a 15); T4 - *B. safensis* + *B. viridifuturi* sv *tropici* (16 a 20); T5 - *A. brasiliense* + *B. viridifuturi* sv *tropici* (21 a 25); T6 - *Pseudomonas* sp. + *B. viridifuturi* sv *tropici* (26 a 30); T7 - *Azohydromonas australica* + *B. viridifuturi* sv *tropici* (31 a 35); T8 - *A. sp.* + *B. viridifuturi* sv *tropici* (36 a 40); T9 - *A. brasiliense* + *B. viridifuturi* sv *tropici* (41 a 45); T10 - *Dyella* sp. + *B. viridifuturi* sv *tropici* (46 a 50); e T11 - *B. safensis* + *A. brasiliense* + *Pseudomonas* sp. + *Azohydromonas australica* + *Azospirillum* sp. + *A. brasiliense* (51 a 55).

O SPAD apresentou uma baixa correlação negativa significativa em relação aos nódulos (nº de nódulos, MFN, MSN) como podem ser observadas na matriz de correlação (Tab. 3).

Tabela 3. Matriz da correlação de Pearson entre as variáveis analisadas ao final do experimento com feijão-caupi.

	PAD	FPA	FR	FN	ltura	ódulos	SPA	SR	SN	FCN
SPA										
D										
MF										
PA	.503									
R	.287	.512								
N	0.50	0.285	0.323							
Al- tura	.296	.819	.579	0.018						
n ^o n ódulos	0.496	0.302	0.404	.971	.001					
MS										
PA	0.033	.711	.103	.157	.712	.140				
R	.021	.241	.145	.044	.301	0.00	.328			
MS										
N	0.476	0.187	0.227	.991	.093	.954	.229	.058		
EF										
CN	0.063	.692	.156	.204	.693	.160	.990	.356	.277	

Os valores em cor verde representam correlações mais positivas e as em vermelho, as correlações mais negativas e segundo a intensidade da cor.

Quando observados os valores para raiz do feijão, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao volume, área e diâmetro.

Tabela 4. Valores médios de volume, área e diâmetro da raiz, em função dos tratamentos testados em feijão caupi “Quarentão” em condições axênicas.

Tratamento	Volume (mm ³ planta ⁻¹)	Área (mm ² planta ⁻¹)	Diâmetro (mm planta ⁻¹)
Trat. com N	2999,70 a	11096,70	64,25
Trat. sem N	3972,41 a	12316,01	60,12
U0384	4127,80 a	11641,53	53,97
U0261+0384	3051,78 a	11094,44	55,77
U0267+0384	2202,45 a	6604,27	46,75
U0306+0384	2043,22 a	7952,92	48,36
U0324+0384	3059,55 a	9857,49	58,18
U0346+0384	4261,28 a	11932,40	74,15
U0327+0384	4350,28 a	12349,26	55,22
U1086+0384	2064,26 a	8452,06	51,92
MIX-OPN	2646,38 a	8832,66	52,81

CV.: 0,00. MSPA: massa seca da parte aérea; MSR: massa seca de raiz; EFCN: eficiência em relação ao tratamento com alta concentração de N mineral. Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância.

Os resultados para inoculação em OPN foram similares entre si e também não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos de inoculação utilizados, apenas para MSPA e EFCN, em que o controle com nitrogênio mineral se destacou, de acordo com as tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Valores médios de SPAD, MFPA, MFR, MSPA, MSR e EFCN em função dos tratamentos testados em ora-pro-nóbis em condições axênicas.

Tratamentos	SPAD	MFPA	MFR	MSPA	MSR	EFCN
	- (g planta ⁻¹)				%
1. Trat. com N	26,84 a	5,48 a	2,73 a	0,86 a	0,795 a	100 a
2. Trat. sem N	24,78 a	2,19 b	1,05 a	0,29 b	0,286 a	35,89 b
3. UFLA0384	25,69 a	2,16 b	0,96 a	0,29 b	0,250 a	35,47 b
4. UFLA261	34,99 a	2,62 b	0,99 a	0,36 b	0,328 a	44,68 b
5. UFLA267	22,06 a	1,949 b	0,93 a	0,28 b	0,239 a	32,68 b
6. UFLA0306	21,09 a	2,27 b	1,03 a	0,30 b	0,250 a	35,72 b
7. UFLA324	17,64 a	2,70 b	1,07 a	0,38 b	0,238 a	45,90 b
8. UFLA346	21,55 a	2,40 b	0,98 a	0,31 b	0,271 a	39,12 b
9. UFLA327	22,58 a	2,28 b	0,93 a	0,32 b	0,230 a	39,98 b
10. UFLA1086	20,54 a	2,13 b	0,99 a	0,32 b	0,273 a	36,69 b
11. MIX-OPN	21,18 a	2,37 b	0,98 a	0,31 b	0,257 a	37,45 b
12. MIX 10X	20,69 a	1,81 b	0,81 a	0,24 b	0,21 a	29,93 b

CV.: 0,00. SPAD: média de cinco leituras com o equipamento, Massa fresca da parte aérea (MFPA), Massa frescad e raiz (MFR), Massa seca da parte aérea, Massa seca de raiz (MSR) e eficiência em relação ao tratamento com alta concentração de N mineral (EFCN). Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de *Scott-knott* a 5% de significância.

Tabela 6. Valores médios de n° de folhas, diâmetro, altura, comprimento, área e volume de raiz em função dos tratamentos testados em ora-pro-nóbis em condições axênicas.

Tratamentos	n° folhas	Diâmetro	Altura	Comp.raiz	Área_raiz	Vol_raiz
	-	(mm planta ⁻¹) (cm planta ⁻¹)	(cm ² planta ⁻¹)	(cm ³ planta ⁻¹)	
1. Trat. com N	9,8 a	5,96 a	6,53 a	5,45 a	9,958 a	2,546 a
2. Trat. sem N	8,0 c	3,99 a	4,15 a	1,89 a	3,045 a	0,672 a
3. UFLA0384	7,3 d	3,60 a	4,05 a	3,07 a	4,610 a	1,077 a
4. UFLA261	8,0 c	4,23 a	4,65 a	2,29 a	2,907 a	0,574 a
5. UFLA267	7,5 d	3,68 a	4,20 a	2,86 a	4,019 a	0,748 a
6. UFLA0306	7,5 d	3,82 a	4,80 a	1,96 a	2,569 a	0,465 a
7. UFLA324	8,0 c	4,06 a	4,73 a	2,31 a	3,363 a	0,692 a
8. UFLA346	7,3 d	3,73 a	4,68 a	3,23 a	4,861 a	1,022 a
9. UFLA327	7,0 e	3,76 a	5,20 a	3,88 a	5,916 a	1,258 a
10. UFLA1086	6,3 f	3,70 a	4,75 a	3,61 a	5,207 a	1,017 a

11. MIX-OPN	8,3 b	3,99 a	4,55 a	2,17 a	3,110 a	0,755 a
12. MIX 10X	6,3 f	2,91 a	4,28 a	2,59 a	4,039 a	0,876 a

CV.: 0.00. Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de *Scott-knott* a 5% de significância.

Houve uma variação dos valores aferidos principalmente para SPAD e altura de plantas, e também diâmetro e número de folhas dentro dos respectivos tratamentos.

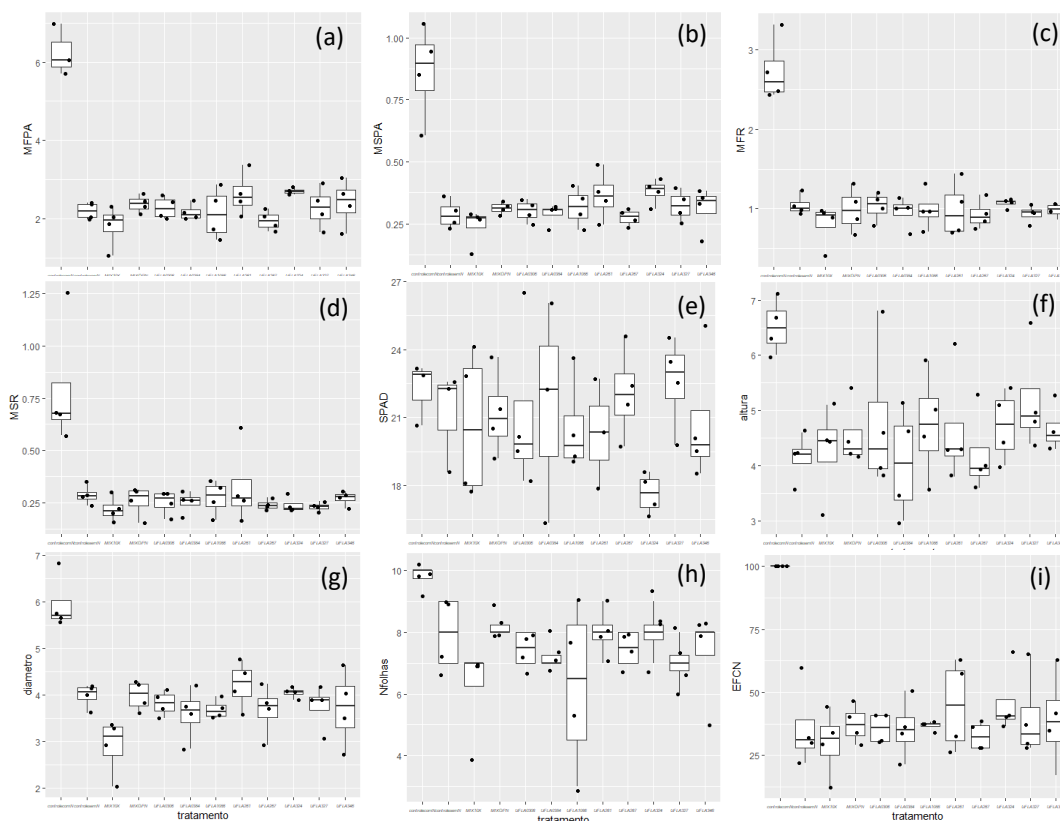


Figura 5. Box Splot da massa fresca e seca da parte aérea - MFPA (a), MSPA(b), massa fresca e seca de raiz - MFR (c), MSR (d), SPAD (e), altura (f) e diâmetro (g) de planta (f), n° de folhas (h) e eficiência em relação ao tratamento com alta concentração de N mineral - EFCN (i) ao final do experimento de OPN. 1. Trat. Com N; 2. Trat. Sem N; 3. MIX 10X; 4. MIX-OPN; 5. UFLA0306; 6. UFLA0384; 7. UFLA1086; 8. UFLA0261; 9. UFLA0267; 10. UFLA0324; 11. UFLA0327; 12. UFLA0346.

Discussão

Foram observados nesses ensaios que para os resultados de MSPA e MSR não demonstraram diferenças significativas, pois tanto os tratamentos inoculados e como os coinoculados se mostraram similares ao tratamento com N mineral em alta e baixa concentração de N (Fig. S1 e S2). A inoculação com as bactérias promotoras de

crescimento de plantas – BPCP não apresentou diferença entre si para os parâmetros de MSR e MSPA, e volume de raiz a planta ora-por-nóbis.

A MSPA demonstrou uma correlação positiva com a EFCN (0,99) e altura, (0,69), ainda que o SPAD tenha apresentado uma correlação negativa em relação aos parâmetros de nódulos (nº de nódulos, MFN e peso). Isso pode ter ocorrido em função de variáveis como reserva inicial da semente e o tempo de condução do experimento, que pode não ter sido suficiente para expressar respostas diferentes, devendo ser maior.

Embora as funções das comunidades bacterianas endofíticas permaneçam desconhecidas em sua maioria, estudos realizados por Naoe et al. (2020), Steiner et al. (2020) e Sheteiwy et al. (2021) apontam que as rizobactérias do gênero *Azospirillum* tem como característica promover o crescimento vegetal pela habilidade de biossíntese de fitohormônios que contribui para o aumento do rendimento das culturas. Em nosso experimento, o tratamento coinoculado com UFLA324+0384 (*Azohydromonas australica* + *B. viridifuturi* sv tropici); UFLA0261+0384 (*B. safensis* + *B. viridifuturi* sv tropici); UFLA0327+0384 (*A. brasiliense*+ *B. viridifuturi* sv tropici) e MIX (*B. viridifuturi* sv tropici, *Bacillus safensis*, *A. brasiliense*, *A. agrícola*, *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp. e *Azohydromonas australica*) em relação ao tratamento sem N apresentaram incrementos na MSPA de 17,7%, 15,5%, 14,59% e 14,41% respectivamente, enquanto que o tratamento com N mineral apresentou um incremento de 16,24%, esse último de forma significativa.

A coinoculação não apresentou diferenças significativas pelos parâmetros mensurados. Carrillo et al. (2002) relataram também que a inoculação do solo com *Azospirillum* aumentou o rendimento da massa da parte aérea (*Pachycereus pringlei*) devido à fixação de nitrogênio e melhoria no sistema radicular quanto absorção de água e minerais pela planta.

O SPAD índice é uma medida indireta do teor de clorofila da folha e pode ser correlacionado com as concentrações de N na planta (CEREZINI et al., 2017). A estirpe *B. safensis* esta descrita na literatura como uma cepa eficaz em melhorar o crescimento e a fisiologia da *Brassica juncea* (L.) sob estresse com Cd (NAZLI et al., 2021). O tratamento coinoculado com UFLA0261+0384 (*Bacillus safensis* + *B. viridifuturi* sv tropici) apresentou um maior número de nódulos, mas sem diferença estatística. Além

disso, e como mostrado por Zgadzaj et al. (2015) algumas bactérias também podem invadir os nódulos de leguminosas usando o fio de infecção induzida por rizóbios.

Quando coinoculado com *Pseudomonas* sp., gênero que abrange estirpes tolerantes a estresses abióticos (OZAWA et al., 2007), e *B. viridifuturi* sv *tropici*, UFLA0306+0384, observamos pouco crescimento em altura, sendo similar ao tratamento sem inoculação e sem disponibilidade de N mineral, diferente significativamente dos demais tratamentos e contrário ao resultado encontrado por Steiner et al. (2020) em que a coinoculação com *B. tropici* e *A. brasilense* resultou em plantas com maior altura e MSPA quando comparado com plantas não inoculadas, em condições não estressantes e estressantes. O tratamento UFLA0306+0384 foi o que apresentou menor número de nódulos, sem diferença estatística, entretanto demonstrou uma maior eficiência em relação ao teor de verde da planta, aferido pelo SPAD, provavelmente porque a planta teve armazenado uma maior concentração de fotossimilados em um volume menor de planta.

Os tratamentos que apresentaram maior nodulação foram o inoculado com UFLA0384 (*B. viridifuturi* sv *tropici*) e os coinoculados com UFLA0324+0384 (*Azohydromonas australica* + *B. viridifuturi* sv *tropici*) e UFLA0346+0384 (*A. sp.* + *B. viridifuturi* sv *tropici*) sem diferença estatística. As bactérias do gênero *Azospirillum*, destacam-se dentro do grupo de microrganismos diazotrófico endofítico por apresentam aptidão como FBN (HUERGO et al. 2008; MARQUES et al. 2017) e promovem o crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios (FUKAMI et al., 2018). Quando observamos no feijão-caupi, talvez a diferença se tornasse maior em função do volume da dose aplicada e em uma época do ano diferente, pois a eficiência da fixação biológica pode sofrer interferências também de fatores como temperatura, umidade do solo (MICHEL et al., 2020, SHETEIWY et al., 2021).

A MSN e número de nódulos pouco correlacionaram com a altura nesse experimento, porém na literatura encontramos resultados positivos com coinoculação na promoção de crescimento de plantas (HUNGRIA et al. 2013; RONDINA et al. 2020; STEINER et al. 2020; BARBOSA et al. 2021) e também na tolerância ao estresse hídrico pela planta e em interação com *Azospirillum* (CORTÉS-PATIÑO et al., 2021). Talvez tenha ocorrido em função da fisiologia da planta de OPN e época de implantação do experimento que ocorreu entre os dias 30 de maio e 05 de agosto de 2021.

A MSR apresentou uma correlação de Pearson positiva e significativa ($p < 0,05$) com a MFPA, entre os tratamentos. Ao observamos os gráficos da figura 2 e as imagens das figuras S1 e S2, os tratamentos UFLA0384 (*B. viridifuturi* sv. tropici), UFLA0261 (*B. safensis*) + 0384 e as estirpes UFLA0346 (*Azospirillum*) + 0384 e UFLA0327 (*A. brasiliense*) + 0384 se mostraram positivamente, corroborando trabalhos quanto aos benefícios da interação com *Azospirillum* (RONDINA et al. 2020; CORTÉS-PATIÑO et al. 2021) em feijão-caupi.

O tratamento MIX, no qual estão presentes todas as estirpes inoculadas separadamente em outros tratamentos, não se mostrou melhor significativamente para nenhuma das variáveis avaliadas e não apresentou vantagens sobre as coinoculações. Entretanto, em trabalho desenvolvido por Silva et al. (2012), à medida que se elevou a taxa de inóculo, aumentaram a nodulação e a contribuição da FBN para o crescimento de plantas de feijão-caupi. Isso nos leva a pensar que poderíamos ter observado diferenças maiores se houvésemos inoculado de forma parcelada ao longo do tempo ou com maior volume de inóculo.

O fato de nenhuma planta apresentar sintomas de doença ou ter crescido menor que o tratamento sem inoculação e sem N mineral, implica que estirpes isoladas não são fitopatógenos ou têm efeitos deletérios para o crescimento das plantas isoladamente. Essas questões são a peça chave nas pesquisas com *Azospirillum*, porque se tivermos uma ideia mais clara de como a bactéria interage com o hospedeiro, podemos prever maneiras de melhorar a interação. De acordo com o comportamento da planta e percentual de nitrogênio na planta constatado em outros trabalhos, os estudos devem persistir com a tentativa de isolamento de outros microrganismos que contribuam de maneira eficaz no crescimento de plantas

Os resultados mais evidentes em função da inoculação em OPN com *Azospirillum* podem ser encontrados na raiz: ramificação, alongamento das raízes laterais e adventícias (DA SILVA et al. 2022), pelos radiculares (SAROJ et al., 2022). O que faz do gênero, forte aliado da planta quando submetida a déficit hídrico, além do mais, é provavelmente o gênero mais estudado de rizobactérias associativas promotoras de crescimento vegetal devido a capacidade de colonizar muitas espécies (CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016).

Os benefícios da co-inoculação de duas ou mais estirpes foi demonstrado por pesquisadores como Oliveira-Longatti et al. (2015), Pinto et al. (2022), Figueiredo et al. (2008), que observaram que algumas rizobactérias, a exemplo: *Rhizobium tropici* e *Paenibacillus polymyxa* podem atenuar alguns efeitos negativos da seca em *Phaseolus vulgaris* L. Vivas et al. (2003) sugerem ainda que bactérias de vida livre e fungos micorrízicos arbusculares devem ser coinoculados para otimizar a formação e o funcionamento da simbiose micorrízica, tanto em condições normais quanto em condições adversas, uma vez que *Bacillus* sp. sob estresse hídrico tiveram um efeito estimulante no desenvolvimento de *Glomus intraradices*.

Devido ao novo contexto da agricultura, que pretende uma produção de alimentos mais sustentável e economicamente viável em face à alterações climáticas perceptíveis ao entorno, se faz necessário obter medidas paliativas que possam reduzir os efeitos negativos causados pelo aumento da temperatura global. O desenvolvimento de tecnologias que auxiliem as plantas a tolerar veranicos ou períodos prolongados de estiagem é o intuito para o crescimento sustentável e minimização dos impactos na agricultura brasileira. Os microrganismos hidratam raízes ou interferem na fisiologia dos vegetais pela produção de fitohormônios que, desse modo, toleram mais ao estresse hídrico.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que a coinoculação com diferentes estirpes associativas separadamente não interferiram na formação da massa seca da parte aérea e raiz do feijão-caupi.

As estirpes isoladas previamente de OPN, embora apresentem FBN de forma associativa em trabalhos anteriores, não apresentaram um resultado esperado no ensaio com OPN.

REFERÊNCIAS

- ASKAR, A., GUL, H., ABBASI, M.W., TARIQ, M., e SHOUJUN, Y. (2020). Isolation and evaluation of halotolerant rhizobacteria from xanthium strumarium l as plant growth promoting rhizobacteria. **Pakistan Journal of Botany**, 52(3), 1097-1104. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-3\(30\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-3(30))
- BASHAN, Y., HOLGUIN, de-BASHAN. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) **Luz E de-Bashan**. **Can J Microbiol.** 50(8):521-77. <https://doi.org/10.1139/w04-035>
- BONATELLI, M. L. et al. (2021) Beneficial plant-associated microorganisms from semiarid regions and seasonally dry environments: a review. **Frontiers in Microbiology** 11: 553223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.553223>
- CARRILLO, A.E., C.Y LI, Y BASHAN. (2002). Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Naturwissenschaften** 89: 428-432.
- CASSÁN, F., DIAZ-ZORITA, M. (2016) *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020> 0038-0717/
- CEREZINI, P., FAGOTTI, D. S. L., PÍPOLO, A. E., HUNGRIA, M., e NOGUEIRA, M. A. (2017). Water restriction and physiological traits in soybean genotypes contrasting for nitrogen fixation drought tolerance. **Scientia Agricola**, 74, 110–117. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0462>
- CORTÉS-PATIÑO, S.; VARGAS, C.; ÁLVAREZ-FLÓREZ, F.; BONILLA, R.; ESTRADA-BONILLA, G. (2121) Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* Consortium to Promote Growth of Perennial Ryegrass underwater Deficit. **Microorganisms**, 9, 91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010091>
- COSTA, E. M. da et al. (2019) Classification of the inoculant strain of cowpea UFLA0384 and of other strains from soils of the Amazon region as *Bradyrhizobium viridifuturi* (symbiovar tropici). **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 50, p. 335-345. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00045-X>
- DA SILVA, M.S.R.; TAVARES, O.C.H.; DE OLIVEIRA, I.S.R. *et al.* (2022) Stimulatory effects of defective and effective 3-indoleacetic acid-producing bacterial strains on rice in an advanced stage of its vegetative cycle. **Braz J Microbiol**, 53, 281–288. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00651-8>
- DÖBEREINER J, BALDANI VLD, BALDANI JI (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília.
- FARIA, S.; CATUNDA, K.; OLIVEIRA, L. M. (2021) Análise química de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*). **Saber Científico (1982-792X)**, v. 8, n. 2, p. 99-103.

FERREIRA, L. de V. M. *et al.* (2018) Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 461-469, 2. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60825-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60825-8)

FIGUEIREDO, M. V.B., BURITY, H. A., MARTÍNEZ, C. R., CHANWAY, C. P. (2008) Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*, **Applied Soil Ecology**, Vol 40, 1, P. 182-188, ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.04.005>

FROTA, K. M. G., SOARES, R. A. M., ARÊAS, J. A. G. (2008). Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 470-476.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. (2018) Mini-review - *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. 8:73 <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

GARCIA J.A.A., CORRÊA R.C.G., BARROS L., PEREIRA C., ABREU R.M.V., ALVES M.J., CALHELHA R.C., BRACHT A., PERALTA R.M., FERREIRA I.C.F.R. (2019) Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nóbis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chem.** Oct 1;294:302-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.074>

HASHASH, Maher Mahmoud et al. Nutritional potential, mineral composition and antioxidant activity squash (*Curcubita pepo* L.) fruits grown in Egypt. **inflammation**, v. 9, n. 10, p. 11-12, 2017.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D. I. (1938). The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.

HOSSAIN, M.D., MOZAMMEL, I. JAHAN, S. AKTER, M.D. N., RAHMAN, S. M. B. RAHMAN. 2015. Effects of *Azospirillum* isolates from paddy fields on the growth of rice plants. **Research in Biotechnology** 6: 15-22.

HUERGO, L.F., MONTEIRO, R.A., BONATTO, A.C., RIGO, L.U., STEFFENS, M.B.R., CRUZ, L.M., CHUBATSU, L.S., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O. (2008) Regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp. **Fisiologia celular, as interações de plantas e pesquisa agrônômica na Argentina**. Associação Argentina de Microbiologia, Argentina.

HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M.A., ARAUJO, R.S. (2013). Coinoculation of soybeans and common beans with *rhizobia* and *azospirilla*: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791–801.

HUNGRIA M, NOGUEIRA M.A., ARAUJO R.S. (2016) Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agric Ecosyst Environ** 221:125–131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>

KAVITHA, V., RAMADAS, V.S., (2013) Nutritional composition of raw fresh and shade dried form os spinach leaf (*Spinach oleracea*). JPR BioMedRx 1, 767 – 770. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03278>

KINUPP, V. F. (2014) Plantas Alimenticias Não Convencionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas / Harri Lorenzi. – São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

LENGWATI, D.M., MATHEWS, C., DAKORA, F.D. (2020) Rotation Benefits From N₂-Fixing Grain Legumes to Cereals: From Increases in Seed Yield and Quality to Greater Household Cash-Income by a Following Maize Crop. **Front. Sustain. Food Syst.**, 19 Sec. Crop Biology and Sustainability. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00094>

MAGALHÃES F.M.M. (1981) Nitrogen fixing bacteria isolated from diversesoils and grass roots in Amazônia. In: Vose P, Ruschel AP (eds) Associative N₂-Fixation, New York, CRC, pp 39-48.

MAPHOSA, Y.; VICTORIA A. J. (2017) **The Role of Legumes in Human Nutrition**. Chapter 6. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69127>

MARQUES, A.C.R. et al. (2017) Biological nitrogen fixation in C₄ grasses of diferente growth strategies of South American natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 54-62.

MICHEL, D.C., VASQUES, I.C.F., ARAÚJO, G. do C.R., DE CASTRO, J.L., DE ASSIS, L.L.R., DOS REIS, R.H.C.L., SILVA, M.L. de S., FAQUIM, V. (2020) Influence of Molybdenum doses in inoculation and mineral fertilization in cowpea beans. **Bioscience Journal** [online], vol. 36, no. 1, pp. 102–112. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-42343>.

MERCÊ, Ana Lucia Ramalho et al. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, and Ni²⁺. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 29-37, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00078-X)

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. (2006). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: UFLA. 729p.

NAOE, A.M.L.; PELUZIO, J.M.; CAMPOS, L.J.M; NAOE, L.K.; SILVA, R.A. (2020) Coinoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars subjected to water deficit. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.24, n 2, Campina Grande, PB, p. 89-94. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v24n2p89-94>

NAZLI, F.; WANG, X.; AHMAD, M.; HUSSAIN, A.; BUSHRA, D.A.R.; NASIM, M.; JAMIL, M.; PANPLUEM, N.; MUSTAFA, A. (2021). Efficacy of Indole Acetic Acid and Exopolysaccharides-Producing *Bacillus safensis* Strain FN13 for Inducing Cd-Stress Tolerance and Plant Growth Promotion in Brassica juncea (L.). **Appl. Sci.** 11(9), 4160. <https://doi.org/10.3390/app11094160>

OLIVEIRA, D. P., RUFINI, MÁRCIA, F. A. D. MARTINS, J. S. SILVA, ARAGAO, O. O. S., SANTANA, M. J., ANDRADE, M. J. B., MOREIRA, FATIMA M.S. (2022) Inoculation with *Rhizobium tropici* can totally replace Nfertilization in the recently released RSMG Uai bean cultivar. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 44, p. 1-8.

OLIVEIRA, E., MATTAR, E.P.L., ARAÚJO, M.L., JESUS, J.C.S., NAGY, A.C.G., SANTOS, V.B. (2015) Descrição de cultivares locais de feijão-caupi coletados na microrregião Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil. **Acta Amazonica**. Vol. 45(3) 243 – 254. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201404553>

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, LEANDRO MARCIANO; MOREIRA, F. M. S. (2013) Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 11, p. 948-959. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR12.1055>

OZAWA, T., J. WU, S. FUJII. (2007). Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* isolated from the endorhizosphere of *Salicornia europaea* on salt tolerance of the glasswort. **Soil Sci. e Plant Nutr.**, 53(1): 12-16.

PINTO, R. A. M. et al. (2022) Resposta da produtividade da soja (*Glycyne max*) em relação a inoculação e co-inoculação em sulco de plantio com as bactérias *Bradyrhizobium elkanii* e *Azospirillum brasilense*. **Anais do Salão de Iniciação Científica Tecnológica** ISSN-2358-8446.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RIBEIRO, E., DE SOUZA ROCHA, Thais, PRUDENCIO, S. H. Potential of green and roasted coffee beans and spent coffee grounds to provide bioactive peptides. **Food Chemistry**, v. 348, p. 129061, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129061>

RONDINA, A.B.L., SANZOVO, A.W.S., GUIMARÃES, G.S., WENDLING, J.R., NOGUEIRA, M.A., HUNGRIA, M. (2020) Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils** <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

SAROJ, R.K., KUMAR, S., YADAV, S. (2022) Effect of bio-fertilizers with chemical fertilizers on growth, yield, and quality of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). **International Journal of Horticulture and Food Science**, 4(1): 26-31 <https://doi.org/10.33545/26631067.2022.v4.i1a.81>

SILVA, M. A., NASCENTE, A. S., REZENDE, C. C., FRASCA, L. L. de M., FILIPPI, M. C. C., LANNA, A. C., FERREIRA, E. P. de B., CRUZ, D. R. C., LACERDA, M. C., FERREIRA, E. A. S. (2022) Multifunctional rhizobacteria: use in agriculture. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. e3111426971. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.26971>

SILVA, M. F., SANTOS, C. E. R., SOUSA, C.A., ARAÚJO, R. S. L., STAMFORD, N.P., FIGUEIREDO, M.V.B. (2012) Nodulation and nitrogen fixation efficiency of cowpea as affected by inoculum rate. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** 36 (5). <https://doi.org/10.1590/S0100-06832012000500005>

SHETEIWY, Mohamed S. et al. Inoculation with *Bacillus amyloliquefaciens* and mycorrhiza confers tolerance to drought stress and improve seed yield and quality of soybean plant. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 4, p. 2153-2169, 2021.

STEINER, F., OLIVEIRA, C.E.S., ZOZ, T., ZUFFO, A.M., FREITAS, R.S. (2020) Co-Inoculation of Common Bean with *Rhizobium* and *Azospirillum* Enhance the Drought Tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**, Vol. 67, No. 5, pp. 923–932. © Pleiades Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1134/S1021443720050167>.

VEGA, C.F., KEMMELMEIR, K., RUFINI, M., CARVALHO, T.S., MOREIRA, F.M.S. (2020). Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Nutrition as Related to Soil Chemical and Physical Attributes and Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00235-9>

VIVAS, A., MARULANDA, A., GÓMEZ, M., BAREA, J.M., AZCÓN R. (2003) Physiological characteristics (SDH and ALP activities) of arbuscular mycorrhizal colonization as affected by *Bacillus thuringiensis* inoculation under two phosphorus levels. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.987-996.

ZGADZAJ, R.; JAMES, E. K.; KELLY, S.; KAWAHARADA, Y.; DE JONGE, N.; JENSEN, D. B. et al. (2015). A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. **PLoS Genet.** 11:e1005280. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005280>

Apêndice B

Tabela S1. Autos vetores da Análise de Componentes Principais em relação aos parâmetros mensurados no experimento com feijão caupi.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
SPAD	0.142411	-0.27222	-0.25513	0.545256	-0.6165	0.357786	0.065862
MFR	-0.34262	0.07963	-0.17143	0.263184	0.576132	0.646079	-0.09741
MFN	-0.01827	0.544005	0.315426	0.267503	-0.17125	0.192055	0.130567
altura	-0.34266	0.010959	-0.13263	0.534717	0.048808	-0.53862	-0.52465
MSPA	-0.46186	0.212468	-0.28092	-0.12572	-0.12577	-0.06924	0.317735
MSR	-0.37119	-0.07896	0.036642	-0.47571	-0.3954	0.303075	-0.58151
peso_nodulo	-0.06217	0.514133	0.432011	0.089572	-0.20022	0.010326	-0.1245
EFCN	-0.49502	0.056777	-0.2207	-0.05458	-0.18846	-0.15008	0.435738
volume	-0.26866	-0.34613	0.522871	0.131076	0.0835	-0.05704	0.193997
area	-0.26905	-0.42983	0.446588	0.075249	-0.03948	0.070996	0.108417
	PC8	PC9	PC10				
SPAD	-0.16187	0.051177	-0.04451				
MFR	-0.1018	-0.08495	-0.03463				
MFN	0.653674	0.148014	-0.01472				
altura	0.098165	0.021604	0.033121				
MSPA	-0.20403	0.58971	0.368599				
MSR	0.140517	0.053883	-0.13907				
peso_nodulo	-0.6508	-0.23648	0.044595				
EFCN	0.100161	-0.58271	-0.32023				
volume	-0.1272	0.394833	-0.54544				
área	0.124022	-0.25645	0.662009				

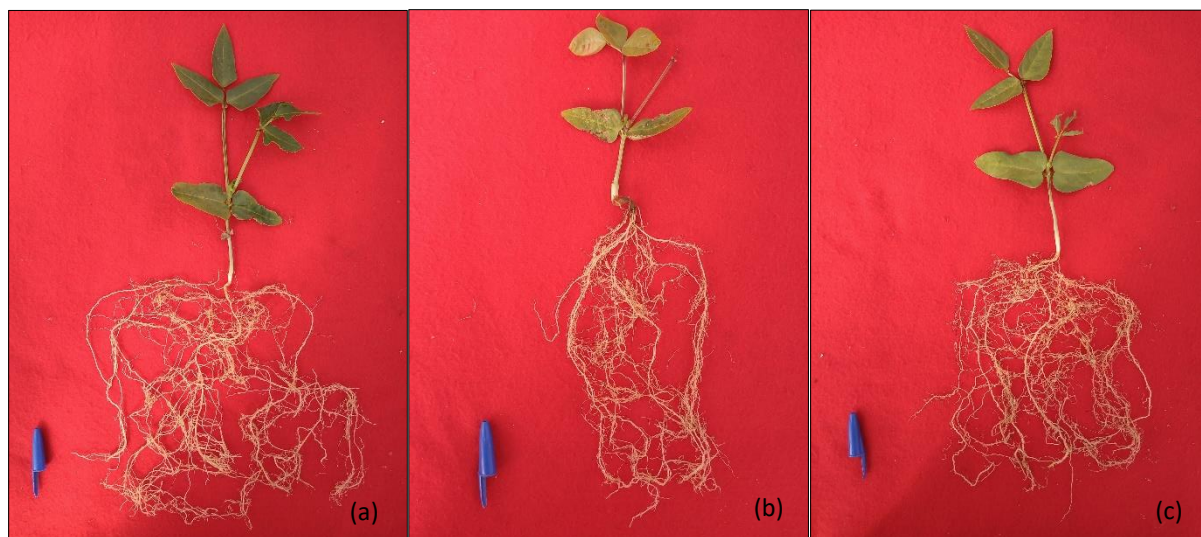


Figura S1. Plantas de feijão-caupi sob diferentes tratamentos de coinoculação. Tratamento com N mineral (a); tratamento sem inoculação e sem N mineral (b) e tratamento coinoculado com UFLA261+0384 (c).

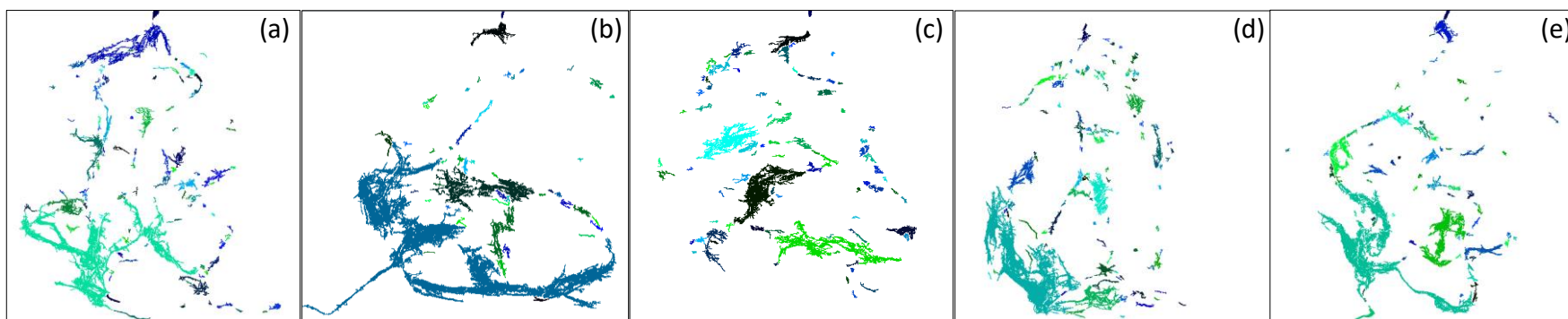


Figura S2. Raízes de feijão caupi sob diferentes tratamentos utilizando o software safira. Tratamento com nitrogênio (a), tratamento UFLA0384 (b), tratamento UFLA261+0384 (c), tratamento UFLA346+0384 (d), tratamento UFLA327+0384 (e)

ARTIGO III - Descrição e anotação genômica da estirpe *Azospirillum itumirinense* sp. nov., isolada da rizosfera de *Pereskia aculeata*

Resumo

A análise do gene 16S rRNA confirmou que a estirpe UFLA0325^T pertence ao gênero *Azospirillum* mostrando um posicionamento próximo a espécie *A. agrícola* CC-HIH038^T, *A. doebereinae* GSF71^T e *A. thiophilum* BV-S^T. A partir da filogenia dos genes housekeeping (*recA*, *rpoD*, *gyrA*, *gryB*) observou-se que a estirpe UFLA0325^T formou um grupo com a espécie *A. agrícola* CC-HIH038^T como também encontrado para o gene *nifH* e posicionou-se próxima das espécies: *A. doebereinae* GSF71^T e *A. griseum* L-25-5^T. O *Average nucleotide identity* (ANI) entre a estirpe desse estudo e a espécie mais próxima *A. doebereinae* GSF71^T foi de 87.5%. Foi encontrado na estirpe os genes relacionados a promoção de crescimento (*nifs*, *ptsN*, *gln*, *ntrB*, *glnG*, *ntrY*, *fixs*). A UFLA0325^T apresentou crescimento até concentrações de 5% NaCl (p/v), pH 9.0 e temperaturas de 40°C. Baseado nesses dados obtidos, propomos que a estirpe UFLA0325^T representa uma nova espécie cujo nome *Azospirillum itumirinense* é proposto.

Palavras-chave: Solo. Itumirim. Alimentícia não-convencional. Associativas.

Introdução

O gênero *Azospirillum*, faz parte da família Rhodospirillaceae, da classe Alphaproteobacteria. Foi proposto por Tarrand et al. (1978), pela primeira vez, para estirpes fixadoras de nitrogênio associada à raiz de gramíneas tropicais, então denominados '*Spirillum lipoferum*'. O gênero *Azospirillum* tem sido isolado da superfície radicular de diferentes plantas brasileiras e apresenta características associativas e de promoção de crescimento de plantas por meio da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas. Compreende bactérias gram-negativas, que aparecem como células vibríóides com flagelos polares e têm um conteúdo de DNA G + C de 69-71 mol% (FALK et al. 1985; ZHAO et al. 2020).

São bactérias de vida-livre e/ou associativas com um movimento vibratório ou semelhante a um saca-rolha característico em meios líquidos por meio de flagelos polares (FALK et al. 1985). Elas não formam esporos, são capazes de crescer sob condições microaerofílicas e suas células são bastonetes ou em forma de espiral. As espécies de *Azospirillum* são largamente distribuídas, especialmente em regiões de solos tropicais, subtropicais e regiões temperadas e estão frequentemente associadas com plantas como gramíneas, cereais e outras culturas (OKON e ITZIGSOHN, 1995).

Azospirillum tem sido relatado como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (RPCP) pela produção de fitohormônios (CACCIARI, 1989). Os representantes desse gênero são cosmopolitas e colonizam uma ampla variedade de habitats, incluindo diversos ambientes, sobretudo associado a raízes de plantas. São bactérias que se desenvolvem bem sob temperaturas entre 28 – 41 °C e muito competitiva em relação a demais bactérias que colonizam a rizosfera, fazendo uso de diferentes fontes de nitrogênio e carbono.

Embora seja um gênero de grande relevância na associação com plantas de milho e cana de açúcar (DOMINGUES et al. 2020), com destaque para a espécie *A. brasilense*, isolada das raízes do trigo (*Triticum aestivum* L.) (BALDANI et al. 1986), até o momento em que este artigo foi escrito, o gênero *Azospirillum* compreende 23 espécies em publicações válidas e seus nomes registrados na LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (<https://www.bacterio.net/> acessado: 05 fev 2023) (EUZÉBY, 1997; PARTE, 2020). Em estudo prévio, 81% das estirpes isoladas da rizosfera de *Pereskia aculeata*, estão dentro do gênero *Azospirillum*, das quais a UFLA0325^T foi identificada como pertencente ao gênero, a partir da filogenia do gene 16S rRNA (VEGA et al., 2020). A partir da filogenia do gene 16S rRNA, realizada neste trabalho, identificamos a estirpe UFLA0325^T como pertencente ao gênero *Azospirillum*. Análises posteriores de genes housekeeping mostraram que esta estirpe se posicionou separadamente das demais espécies já descritas e depositadas no banco de dados. Dessa forma, a partir desses resultados, realizou-se a média de identidade de nucleotídeos (ANI) e concluiu-se que a estirpe em estudo é uma nova espécie, para a qual o nome *Azospirillum itumirinense* sp. nov. foi proposto.

Material e Métodos

Origem da estirpe

A estirpe UFLA0325^T foi isolada da rizosfera de *Pereskia aculeata* (Ora-pro-nóbis). Esta planta foi coletada no município de Itumirim (21° 13' 20.26'' S; 44° 52' 40.40'' O), 829 m de altitude, em água. O isolamento da estirpe diazotrófica foi realizado a partir do macerado das raízes lavadas em água e conforme descrito em VEGA et al. (2020). Foi extraída uma alíquota de 0,1 ml do macerado de raiz em água e introduzido em meio de cultura semi-sólido Nfb (DÖBEREINER et al., 1995) reduzido o ácido málico para 0,5g L⁻¹ e acrescido a mesma quantidade de manitol e sacarose (MAGALHÃES, 1981), no qual foi acrescido 0,2 g de extrato de levedura e 18 g de

agarose (Tab. S1). Incubadas a 28° C em câmara de crescimento. Para conservação e armazenamento, os isolados foram colocados em água destilada esterilizada à temperatura ambiente e também liofilizados anteriormente por VEGA et al. (2020).

Sequenciação do genoma inteiro e anotação genômica

Para obter a sequência genômica da estirpe, esta foi cultivada em meio de cultura líquido NFb (DÖBEREINER et al., 1995) reduzido o ácido málico para 0,5g L⁻¹ e acrescido a mesma quantidade de manitol e sacarose (MAGALHÃES, 1981) durante 2-3 dias. Depois disso, uma alíquota de 1 mL deste meio foi transferida para microtubos para seguir com o protocolo de extração de DNA do kit de purificação de DNA genômico Wizard®. A preparação da biblioteca do DNA genômico foi realizada utilizando o kit de biblioteca NexteraXT (Illumina, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. KAPA SYBR® FAST qPCR com QuantStudio ® 5 System (Applied Biosystems, California, USA) foi utilizado para medir a quantidade final da biblioteca. A qualidade da biblioteca foi avaliada pela TapeStation HSD1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, EUA). Foi realizado um pooling equimolar de bibliotecas, e leituras de pares (2X150 bases) foram sequenciadas num Illumina® HiSeq X (Illumina, Califórnia, EUA) com uma configuração de comprimento de leitura de 150 PE para leituras de 1,6 M PE (0,8M em cada direcção) por amostra. A montagem da UFLA0325^T foi realizada utilizando SPADes 3.13.0 (BANKEVICH et al. 2012). A qualidade e integridade dos genomas foram verificadas com CheckM 1.0.18 (PARKS et al. 2015). A anotação dos genes foi feita com RAST (AZIZ et al., 2008). Todas estas análises foram realizadas utilizando a plataforma Kbase (<https://www.kbase.us/>).

Análise filogenética

As análises filogenéticas consistiram na filogenia do gene 16S rRNA (1214 pb) com 25 estirpes tipo e seus respectivos genomas, na MLSA (multilocus sequence analysis) dos genes housekeeping *gyrA* (867 pb), *gyrB* (1044 pb), *recA* (1909 pb) e *rpoD* (738 pb) e na filogenia do gene simbiótico *nifH* de 18 estirpes tipo. As estirpes que não apresentaram sequências com qualidade foram descartadas, haja vista que apresentavam uma distância na árvore 16S rRNA em relação a UFLA0325^T. A sequência do gene 16S rRNA foi extraído do genoma da estirpe UFLA0325^T, utilizando o programa Miga (RODRIGUEZ-R et al., 2018). As sequências dos genes

housekeeping foram obtidas a partir do genoma da estirpe UFLA0325^T, utilizando a plataforma kbase (ARKIN et al. 2018) e o algoritmo RAST (AZIZ et al., 2008).

Para a construção das árvores filogenéticas dos genes 16S rRNA, dos genes housekeeping e do gene *nifH* foram utilizadas as sequências desses genes já depositados no NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov) das espécies já descritas. As sequências dos genes não depositados no banco de dados foram extraídas dos genomas das estirpes tipo das espécies já descritas.

Os alinhamentos múltiplos das sequências de cada um dos genes estudados foi realizado utilizando o programa Muscle (EDGAR, 2004). As sequências foram editadas e as filogenias construídas no programa Mega versão X (KUMAR et al. 2018) utilizando o método estatístico *maximum likelihood* (FELSENSTEIN 1981) com *bootstrap* de 1000. Para a árvore do gene 16S rRNA o melhor modelo encontrado foi Tamura-Nei (TN93). Para os genes housekeeping (*gyrA*, *gyrB*, *recA* e *rpoD*) concatenados no programa Seaview version 5.0.5 (GOUY et al. 2010) e o gene *nifH*, o melhor modelo ajustado foi GTR - General Time Reversible.

A similaridade entre as estirpes tipo das espécies já descritas de *Azospirillum* e da estirpe UFLA0325^T para cada gene estudado foi feita utilizando o programa RStudio (R Core Team, 2021). O script utilizado encontra-se detalhado no material suplementar S1.

ANI (average nucleotidy identity)

Diante dos avanços nos estudos taxonômicos e o aumento da disponibilidade dos genomas disponíveis de espécies já descritas neste gênero, têm sido recomendados cada vez mais, a utilização de ferramentas de comparação genômica como o ANI (DE LAJUDIE et al., 1998). Dessa forma, realizou-se a análise de similaridade do genoma sequenciado da estirpe UFLA0325^T com 23 genomas das espécies de *Azospirillum* já descritas e existentes no banco de dados do NCBI.

A ferramenta utilizada para essa análise foi o FastANI v.0.1.3 (GORIS et al., 2007) pela plataforma Kbase para verificar se a estirpe em estudo pertence ou não a uma nova espécie, comparando-a com cada estirpe tipo. Nela, foram comparados o genoma em estudo e todas as estirpes tipo já descritas para o gênero. Como segunda checagem, uma matriz de ANI foi calculado na plataforma enve-omics (<http://enve-omics.ce.gatech.edu>). Nela são calculados percentuais de similaridade entre os genomas, par a par. Em ambas as análises, o percentual de corte de 95-96% de

similaridade entre as estirpes como sugerido pela literatura para a diferenciação de espécies em procariotos (GORIS et al., 2007; RICHTER e ROSSELLO-MORÁ, 2009)

Para as duas análises foram selecionadas todas as estirpes tipo das espécies de *Azospirillum* já descritas (<https://www.bacterio.net/> acesso: 04 de fevereiro, 2023) e validadas pelo *International Committee on Systematics of Prokaryotes* - ICSB (DE VOS, TRUPER, 2000). As espécies *A. brasiliense* (NBRC102289^T), *Candidatus Azospirillum* (EF394925^T) e *A. largomobile* (DSM9441^T) não foram inseridas, pois são variantes ortográficas imprecisas (MURRAY, SCHLEIFER, 1994) ; *Candidatus Azospirillum massiliensis* (URAM1^T), *Azospirillum palatum* (LMG24444^T), *A. tabaci* (KCTC82186^T), *A. oleiclasticum* (CGMCC1.13426^T) não são publicações válidas; *A. amazonense* (ATCC35119^T) e *A. irakense* (ATCC51182^T) que possuem sinônimos, além da *A. canadense*, *A. fermentarum* e *A. zea* que não foram encontrados. Os genomas das estirpes tipo das espécies de *Azospirillum* utilizadas na análise foram obtidos do banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Caracterização morfológica, fisiológica e fenotípica

O potencial de fixação biológica de nitrogênio foi identificado quando isolado no meio de cultura NFb modificado sólido (DÖBEREINER et al., 1995) reduzido o ácido málico para 0,5g L⁻¹ e acrescido a mesma quantidade de manitol e sacarose (MAGALHÃES, 1981), incubados a 28 °C por 10 dias, e confirmada pela formação de película na superfície. Para a caracterização morfológica da estirpe UFLA0325^T, foi incubada por 72 horas em câmara de crescimento a 28 °C em meio de cultura NFb. A coloração de gram foi realizada como descrito anteriormente (MURRAY, DOESTSCH e ROBINOW, 1994). Os testes fisiológicos foram realizados em meio líquido NFb modificado e meio sólido Dyg's (FERREIRA et al., 2020) em 3 repetições e experimentos independentes sob uma variedade de condições, segundo Tikhonova, Grouzdev e Kravchenko (2019).

A atividade da catalase foi examinada pela adição de 5% (v / v) solução de H₂O₂ para as colônias. As faixas de temperatura testadas para crescimento foram entre 15 – 40°C. O pH de crescimento foi determinado no meio NFb líquido e sólido modificados com pH de 3 a 9 com um incremento de 0,5. HCl a 1% foi usado para ajustar o pH de 3 a 5, KOH 10% foi usado para pH 6 a 9. A tolerância ao sal foi testada no mesmo meio contendo 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4% (p / v) de NaCl. A resistência à antibióticos foi testada em meio DIGs sólido quanto a presença de ácido nalidixico (30 mcg), amicacina

(30 mcg), amoxicilina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), azitromicina (15 mcg), aztreoanam (30 mcg), cefuroxima (30 mcg), claritromicina (15 mcg), cloranfenicol (30 mcg), doxiciclina (30 mcg), eritromicina (15 mcg), estreptomicina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), lincomicina (2 mcg), neomicina (30 mcg), oxalina (1 mcg), penicilina (10 UI), polimixina (300 UI), rifamicina (5 mcg), sulfonamida (300 mcg), tetraciclina (30 mcg) e vancomicina (30 mcg).

A utilização de fontes de carbono e nitrogênio individuais e demais análises fisiológicas foram investigadas utilizando o kit de testes API 20NE seguindo as instruções do fabricante (bio- Merieux) com incubação a 37 C e conforme metodologia previamente descrita (MICHEL et al., 2017).

Resultados e discussões

Análise filogenética

A estirpe em estudo comparadas com 18 espécies já descritas no gênero *Azospirillum* mostrou que a UFLA0325^T se posicionou no mesmo clado das espécies *A. agrícola* CC-HIH038^T, *A. doebereinae* GSF71^T, *A. griseum* L 25 SW1^T na árvore 16S rRNA (Fig. 1). Devido ao alto grau de conservação desse gene e sua baixa resolutividade a nível de espécie, o estudo de genes housekeeping a partir da MLSA foi realizada. A partir da MLSA foi possível observar que, como encontrado na árvore do gene 16S rRNA a estirpe tipo *A. agrícola* CC-HIH038^T se posicionou no mesmo grupo da estirpe UFLA0325^T com alto suporte estatístico (100%) e mostrou-se mais próxima da estirpe em estudo, 97.2% de similaridade, seguida da estirpe tipo da espécie *A. doebereinae* GSF71^T com 93.9% (Tab. S2).

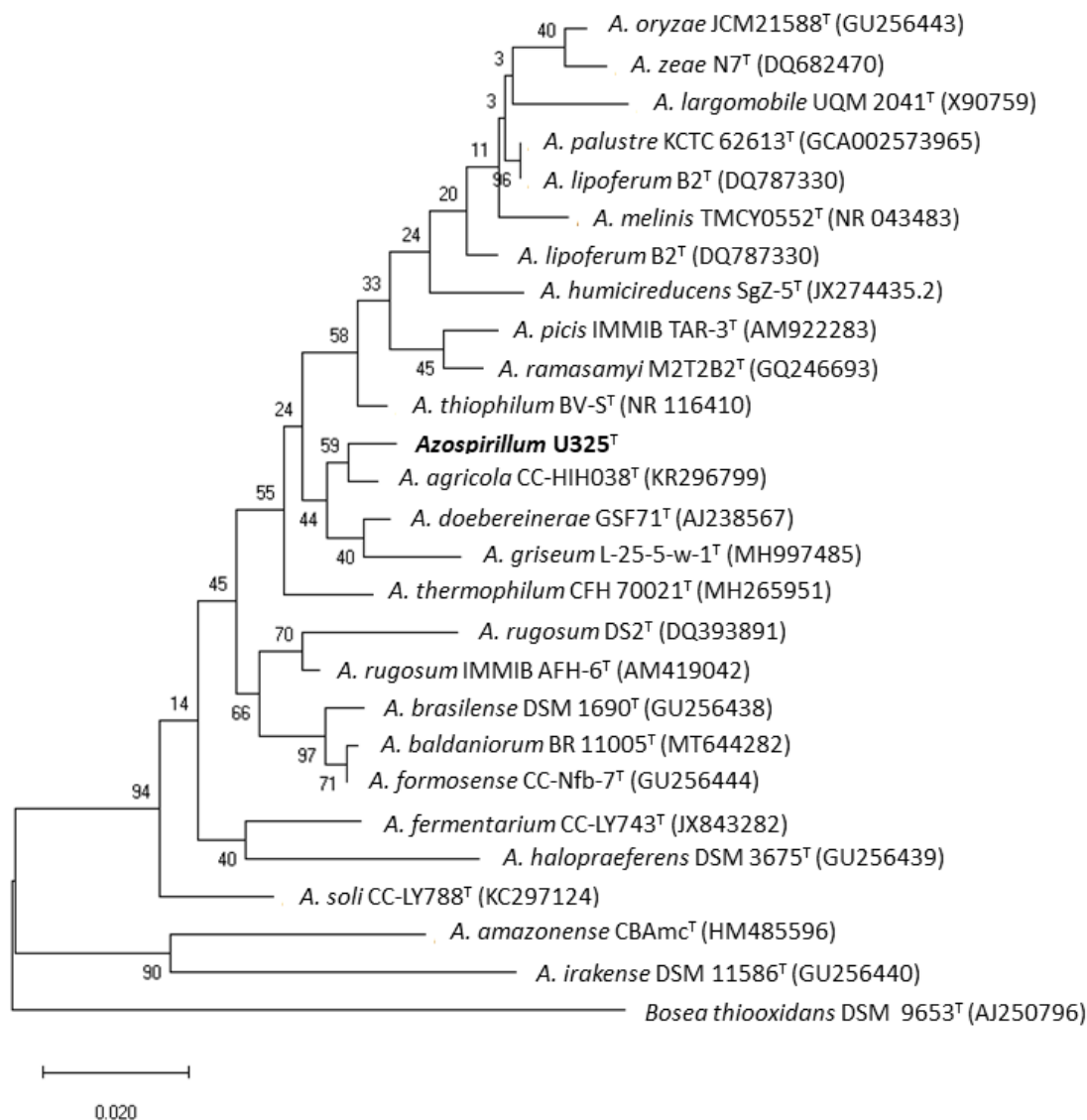


Figura 1. Árvore filogenética com base nas sequências do gene 16S rRNA mostrando as relações entre a nova estirpe e as espécies tipo (T) do gênero *Azospirillum* com Maximum-Likelihood utilizando o modelo Tamura-Nei (TN93). Os valores de bootstrap foram inferidos de 1000 repetições e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Os números de acesso do GenBank são fornecidos entre parênteses. *Bosa thiooxidans* DSM 9653^T foi incluída como grupo externo.

Genes relacionados a nodulação e fixação biológica de nitrogênio são geralmente estudados uma vez que a presença deles são essenciais para que enzimas sejam codificadas e a FBN ocorra. Dentre esses genes, está o *nifH*, diretamente responsável pela síntese da nitrogenase (LIEBRENZ et al., 2022). A filogenia desse gene evidenciou que assim como nos genes 16S rRNA e na árvore concatenada dos genes housekeeping a estirpe em estudo se posicionou no mesmo clado da estirpe tipo da espécie já descrita *A. agricola* CC-HIH038^T com um suporte estatístico de 80% (Fig. 2) e apresentou maior similaridade com essa mesma espécie (97.6%).

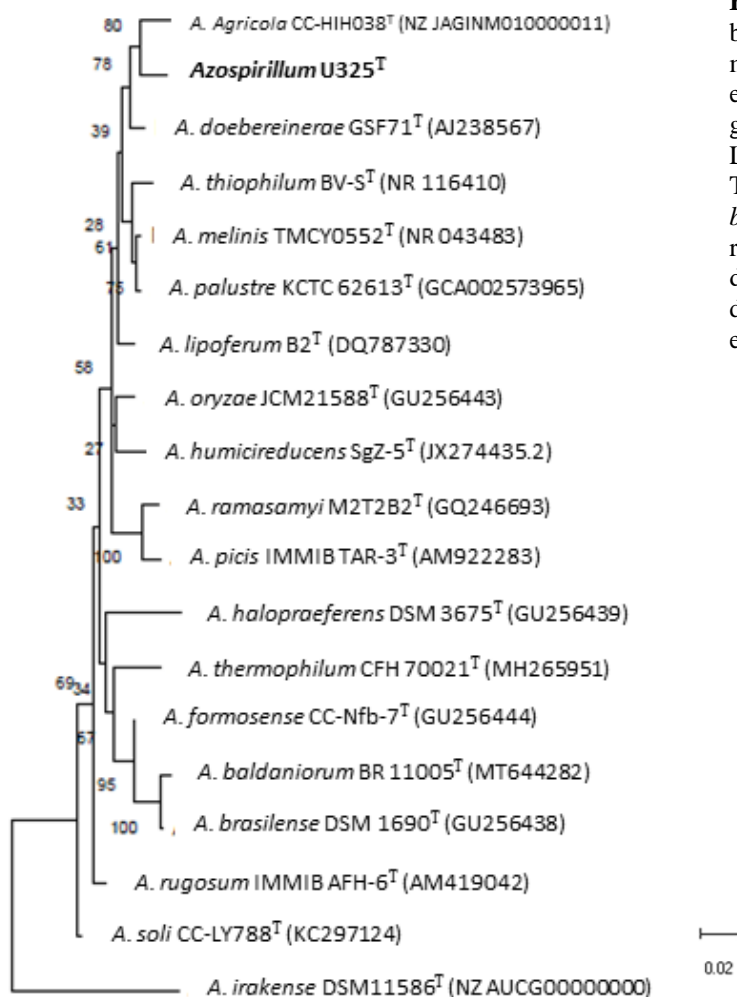


Figura 2. Árvore filogenética com base nas sequências do gene *nifH* mostrando as relações entre a nova estirpe e as espécies tipo (T) do gênero *Azospirillum* com Maximum-Likelihood utilizando o modelo Tamura-Nei (TN93). Os valores de *bootstrap* foram inferidos de 1000 repetições e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Os números de acesso do GenBank são fornecidos entre parênteses.

Os resultados obtidos com a árvore concatenada dos genes, observamos que o clado com a UFLA0325^T segue junto com as demais estirpes já vista na árvore 16S rRNA, *A. agrícola* CC-HIH038^T, *A. doebereineriae* GSF71^T, *A. griseum* L 25 SW1^T.

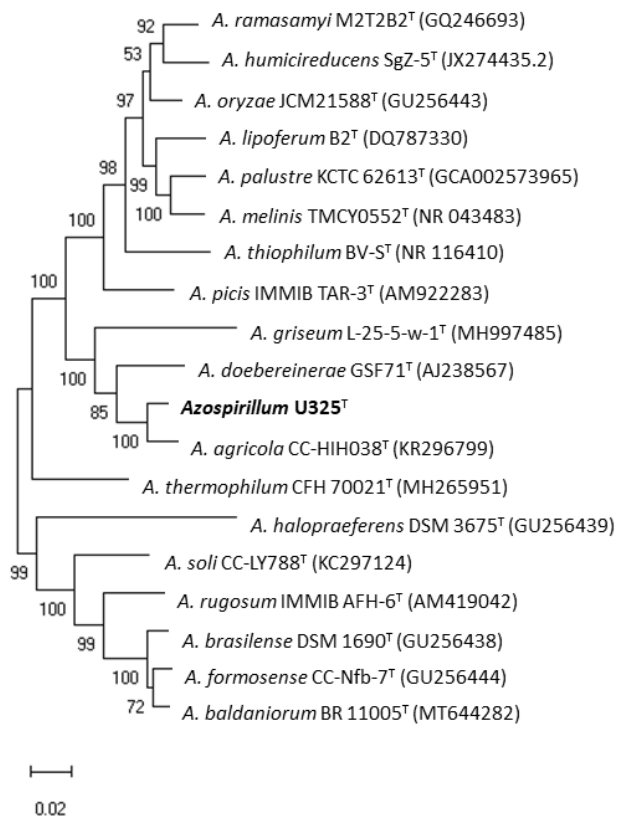


Figura 3. Árvore filogenética concatenada com base nas sequências dos genes *gyrA*, *gyrB*, *recA* e *rpoD* mostrando as relações entre a nova estirpe e as espécies tipo (T) do gênero *Azospirillum* com Maximum-Likelihood utilizando o modelo Tamura-Nei (TN93). Os valores de bootstrap foram inferidos de 1000 repetições e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Os números de acesso do GenBank são fornecidos entre parênteses.

ANI (average nucleotidy identity) e conteúdo de G+C

O método ANI é utilizado para determinar a distância evolutiva entre um par de estirpes dos valores de similaridade de regiões genômicas homólogas compartilhadas pelos genomas (KIM et al. 2014), em que o percentual de similaridade superior a 95~96% são considerados pertencer à mesma espécie.

Os resultados encontrados pela matriz do ANI (RODRIGUEZ e KONSTANTINIDIS, 2016), a estirpe UFLA se mostrou mais próxima das espécies tipo *A. doebereinae* (GSF71^T) e *A. thiophilum* (BV-S^T) com valores de 87.65% e 84.43%, respectivamente (Tab. 1) e pela plataforma kbase (Tab. 2). A terceira mais próxima foi *A. picis* (IMMIB TAR-3^T) com 84.04%. Na tabela 2 todas as espécies de *Azospirillum* comparadas com a UFLA0325^T também apresentaram valores de ANI inferiores a 90%, segundo a plataforma Kbase: *A. doebereinae* (GSF71^T) (76,67%), *A. thiophilum* (BV-S^T) (85,42%) e *A. picis* IMMIB TAR-3^T (84,69%). Visto isso e considerando o percentual de corte de 95-96% para discriminação de espécies, pode-se concluir que a estirpe UFLA0305^T representa uma nova espécie.

Tabela 1. Porcentagem de semelhança de nucleotídeos aos pares das sequências completas entre a estirpe UFLA0325^T e as estirpes do tipo de referência das espécies mais próximas; os códigos de identificação são dados entre parênteses.

Estirpes	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>A. sp.</i> UFLA0325 ^T	87,65	84,43	84,04	84,39	84,23	84,12	83,95
2 <i>A. doebereinae</i> (GSF71 ^T)		83,92	83,50	83,82	83,59	83,39	83,33
3 <i>A. thiophilum</i> (BV-S ^T)			86,02	87,27	87,08	87,39	87,04
4 <i>A. picis</i> (IMMIB TAR-3 ^T)				85,97	85,87	85,93	85,87
5 <i>A. palustre</i> (KCTC62613 ^T)					94,77	89,78	90,46
6 <i>A. melinis</i> (TMCY0552 ^T)						89,64	90,43
7 <i>A. oryzae</i> (KACC_14407 ^T)							89,84
8 <i>A. lipoferum</i> (Sp59b ^T)							-

Tabela 2. Comparação entre os valores de ANI pela plataforma Kbase e Kostas Lab.

Estirpes	<i>Azospirillum sp.</i> UFLA0325 ^T	
	ANI (kbase)	ANI (Kostas Lab)
<i>A. doebereinae</i> (GSF71 ^T)	76,67	87,65
<i>A. thiophilum</i> (BV-S ^T)	85,42	84,43
<i>A. picis</i> (IMMIB TAR-3 ^T)	84,69	84,04

O conteúdo de G + C no DNA da estirpe UFLA0325^T obtida a partir do genoma foi de 68,74 mol%. Esse percentual diferente aos encontrados para as estirpes tipo das espécies *A. doebereinae* GSF71^T (68,89%) e *A. thiophilum* (BV-ST) (68,16%).

Anotação genômica

Genes *nifs* e *fix*

Genes *Nif* são induzidos principalmente por condições de baixo oxigênio e a transmissão desse sinal envolvem a ativação do mesmo (FICHER et al. 1994). Além da capacidade de resposta ao oxigênio da proteína *NifA*, sua síntese é regulada pelo oxigênio no nível da transcrição; *NifB*, uma proteína extremamente instável e sensível ao oxigênio que catalisa uma reação dependente do radical SAM de baixo potencial (ARRAGAIN et al., 2017), um intermediário obrigatório na biossíntese dos cofatores do sítio ativo de todas as nitrogenases conhecidas. Outros genes estão correlacionados com a estirpe UFLA0325^T e envolvidos na Nitrogenase (molibdênio-ferro) redutase e proteína de maturação (*NifH*), em estrutura de cofator Nitrogenase FeMo e proteína de montagem (*NifE*, *NifN* e *NifO*), Proteína-Q de entrega de molibdênio de síntese de cofator de FeMo de Nitrogenase; Proteína-X transportadora de Nitrogenase FeMo-cofator; Proteína estabilizadora/protetora de nitrogênio (*NifW*), como proteína

reguladora de nitrogênio semelhante a PTS IIA (*PtsN*), proteína reguladora de nitrogênio P-II (*GlnK*), proteína reguladora de nitrogênio (*NtrBC=GlnG*) e ainda como proteína reguladora de nitrogênio/proteína reguladora de assimilação de nitrogênio (*NtrK*) (Tab. S3).

A atividade de *FixJ* é modulada via fosforilação-desfosforilação pela hemoproteína do sensor cognato *FixL*, ambos presentes na estirpe UFLA0325T. Os *fixABCX* foram os primeiros genes caracterizados do grupo *Rhizobium*, que são necessários para a fixação de nitrogênio microaerofílico de vida livre como em *Bradyrhizobium japonicum* e *Azorhizobium caulinodans* (SPEROTTO et al., 2004), ambos identificados na nossa estirpe UFLA0325^T. Foram identificados ainda outros genes reguladores do processo de fixação de nitrogênio e desnitrificação, segundo Creus et al. (2005) e Ferreira et al. (2020): *nap*, *nor* e *nos*.

Genes de resistência

Foram identificados diversos genes de resistência, entre eles, o gene *CorA*, um transportador de membrana de magnésio/níquel/cobalto, o principal transportador de magnésio para muitas bactérias (Tab. S4). É uma proteína de membrana interna ubíqua pertencente à família de transportadores de metais bivalentes e a sua patogênese tem sido estudada em vários organismos (KERSEY, AGYEMANG, DUMENYO, 2011; MATTHIES et al. 2016). Existem diferentes genes de resistência a metais em bactérias que podem ser usados como biomarcadores, incluindo facilitadores de difusão de cátions que transportam íons metálicos. Entre eles o transportador de cobalto-zinco-cádmio (*czcD*) foi identificado na estirpe UFLA0325^T, e presente em *Bacillus megaterium* e *Microbacterium liquefaciens* segundo Fierros-Romero et al. (2019) e que pode ser utilizado como biomarcador de poluição por níquel e vanádio em microrganismos, conforme esses autores apontam.

Caracterização morfológica, fisiológica e fenotípica

A estirpe UFLA0325^T foi incapaz de utilizar nitrato como fonte única de nitrogênio e não se mostrou positivo para produção de indol, assim como *A. thiophilum*. Observamos resultados positivos para fermentação (glucose), arginina dihidrolase, urease, B-glucosidase, protease e para-NitroPhenyl-BD-Galactopyranosidase. Carboidratos como D-glucose podem ser utilizados por algumas espécies (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987) e como a estirpe UFLA0325^T, demonstrou ser

positiva para arabinose, manose, manitol e maltose. A UFLA0325^T também foi testada quanto ao citrato trissódico – Na₃(C₆H₅O₇), frequentemente utilizado como conservante e na indústria farmacêutica. O teste para ácido fenilacético foi positivo, assim como para a estirpe *A. doebereineriae* (ECKERT et al. 2001). A estirpe UFLA0325^T demonstrou resultados negativos para gluconato de potássio, ácido capríco e adipico e malato.

A estirpe UFLA0325^T é facultativamente aeróbica, capaz de crescer a temperatura de 15–40 °C, com um ótimo a temperatura de 30°C; pH entre 5,0 e 9,0, com um ótimo a 6,5 e tolera menos de 2,5% de NaCl (p/v) em caldo nutriente. Além disso, a estirpe UFLA0325^T apresentou diversas características fisiológicas e bioquímicas distintas ao ser comparada com as estirpes *A. thiophilum* BV-ST e *A. doebereineriae* GSF71^T. Uma comparação das propriedades fenotípicas pode ser observada na Tabela 2.

Os testes com antibióticos foram susceptíveis para ácido nalidixico, amicacina, azitromicina, cefuroxima, claritromicina, cloranfenicol, doxiciclina, streptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, polimixina, rifamicina, sulfonamides, tetraciclina e vancomicina. E tolerante em relação aos antibióticos: amoxicilina, ampicilina, aztreonam, eritromicina, lincomicina, oxacilina e penicilina. Em conclusão, os resultados do presente estudo, incluindo evidências morfológicas e filogenéticas e diferenças fisiológicas e bioquímicas, indicam que a estirpe UFLA0325^T representa uma nova espécie de o gênero *Azospirillum*, para o qual o nome *Azospirillum itumirinense* é proposto.

Tabela 2. Características que diferenciam *A. UFLA0325^T* das espécies mais próximas utilizando o kit de testes API 20NE.

Testes	UFLA0325 ^T	<i>A. thiophilum</i> ¹	<i>A. doebereineriae</i> ²
Redução de nitrato	-	+	ND
Produção indol (TryptoPhane)	-	-	ND
Fermentação (GLUcose)	+	ND	ND
Arginine DiHydrolase	+		ND
Urease	+	-	+
ND Hydrolysis (B-glucosidase) (Esculin)	+	ND	+
Hydrolysis (Protease) (Gelatina)	+	-	-

B-galactosidade (Para-NitroPhenyl- BD- Galactopyranosidase)	+	ND	+
Glucose	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Mannose	+	-	-
Mannitol	+	+	+
N-acetyl-Glucosamine	+	ND	-
Maltose	+	+	-
Potassium GlucoNate	-	ND	ND
Ácido caprico	-	ND	ND
Ácido adipico	-	ND	ND
Malate	-	+	+
Trisodium citrate	+	ND	ND
Ácido Phenylacetic	+	ND	+

Fonte: ¹ Lavrinenko et al. (2010); ²Eckert et al. (2001). ND = unidentified.

Descrição da espécie

As células são diazotróficas Gram-negativas, aeróbicas e em forma de espiral, (tamanho em μm de comprimento). As colônias são de cor creme, convexa, moderada, gomosa e brilhante após 2 dias de incubação e cerca de 3 mm em meio NFb sólido. O crescimento ocorre entre 0-1,5% (p/v) NaCl (ótimo 1,5%), em pH 5,0-9,0 (ótimo 6,5) e 15–40 °C (ótimo 30 C). As células são capazes de crescer em meio livre de nitrogênio, meio líquido NFb e meio sólido Dyg's. Positivo para catalase, fermentação da glucose, arginina, urease, B-glucosidase, protease, B galactosidase, n-acetil-glucosamina, citrato trisodico e ácido feniácético. Utiliza de vários compostos como única fonte de carbono, incluindo sacarose, glucose, arabinose, manose, manitol, maltose. A UFLA0325^T apresentou resistência aos antibióticos: amoxicilina, ampicilina, aztreonan, eritromicina, lincomicina, oxacilina e penicilina. O conteúdo de DNA G+C da estirpe tipo é $68.74 \pm 0,1$ mol %. A estirpe tipo, UFLA0325^T foi isolado de uma cactaceae *Pereskia aculeata* no estado de Minas Gerais. O genoma e sequência de rRNA 16S da estirpe UFLA0325^T foi depositado no GenBank sob número _____.

REFERÊNCIAS

- ARKIN A.P.; COTTINGHAM R.W.; HENRY C.S.; HARRIS N.L.; STEVENS R.L.; MASLOV S. *et al.* (2018) KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. **Nature Biotechnology**. 36: 566. <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>
- ARRAGAIN S.; JIMÉNEZ-VICENTE E.; SCANDURRA A.A.; BURÉN S.; RUBIO L.M.; ECHAVARRI-ERASUN C. (2017) Diversity and Functional Analysis of the FeMo-Cofactor Maturase *NifB*. **Front Plant Sci**. 14;8:1947. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01947>.
- AZIZ, RAMY K. *et al.* (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-15.
- BALDANI V.L.D.; ALVAREZ M.A. DE B.; BALDANI J.I.; DÖBEREINER J. (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant Soil**; 90:35–46.
- BANKEVICH A.; NURK S.; ANTIPOV D.; GUREVICH A.A.; DVORKIN M. *et al.* (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol**. 19:455–477
- CACCIARI, I. *et al.* Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and soil**, v. 115, p. 151-153, 1989.
- CREUS C.M.; GRAZIANO M.; CASANOVAS E.M.; PEREYRA M.A.; SIMONTACCHI M. *et al.* (2005) Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**; 221:297–303.
- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B. *et al.* (1998). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 48, 369–382. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-369>
- DE VOS P.; TRÜPER H.G. (2000) Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology IXth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 14, Sydney, Australia. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 50, 2239-2244.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. (1987) **Nitrogen-Fixing Bacteria in Nonleguminous Crop Plants**. Springer, Madison.
- DOMINGUES D.; CAMILA FERNANDES *et al.* (2020) *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. **Rev. mex. de cienc. pecuarias** [online], vol.11, n.1, pp.223-240. ISSN 2448-6698. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>.
- ECKERT B.; WEBER O.B.; KIRCHHOF G.; HALBRITTER A.; STOFFELS M.; HARTMANN A. (2001) *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing

bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int J Syst Evol Microbiol.**51 (Pt 1):17-26. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>

EDGAR R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, Volume 32, Issue 5, 1, P. 1792–1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

EUZÉBY, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, 590-592. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>

FALK E.C.; DÖBEREINER J.; JOHNSON J.L.; KRIEG N.R. (1985) Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães et al. 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 1985; 35:117-118.

FELSENSTEIN, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal Mol Evol** 17, 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>

FERREIRA N. S.; HAYASHI SANT' ANNA F.; MASSENA REIS V.; AMBROSINI A.; GAZOLLA VOLPIANO C.; ROTHBALLER M.; SCHWAB S.; BAURA V.A.; BALSANELLI E.; PEDROSA F.O.; PEREIRA PASSAGLIA L.M.; MALTEMPI DE SOUZA E.; HARTMANN A.; CASSAN F.; ZILLI J.E. (2020) Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** Dec; 70(12):6203-6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>

FIERROS-ROMERO G.; GÓMEZ-RAMÍREZ, M.; ASHUTOSH SHARMA,REYNALDO C. PLESS; G. ROJAS-AVELIZAPA G.N. (2019) *czcD* gene from *Bacillus megaterium* and *Microbacterium liquefaciens* as a potential nickel–vanadium soil pollution biomarker **Journal of Basic Microbiology**, Volume 60, Issue 1 p. 22-26. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900323>

GOUY M.; TANNIER E.; COMTE N.; PARSONS D.P. (2021) Seaview Version 5: A Multiplatform Software for Multiple Sequence Alignment, Molecular Phylogenetic Analyses, and Tree Reconciliation. **Methods Mol Biol.** 2021;2231:241-260. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_15.

GORIS J.; KONSTANTINIDIS K.T.; KLAPPENBACH J.A.; COENYE T, VANDAMME P.; TIEDJE J.M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **Int J Syst Evol Microbiol**, 57(Pt 1):81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>.

KERSEY, C.M.; AGYEMANG, P.A.; DUMENYO, C.K. (2011). *CorA*, the magnesium/nickel/cobalt transporter, affects virulence and extracellular enzyme production in the soft rot pathogen *Pectobacterium carotovorum*. **Molecular Plant Pathology**. Bsp and Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00726.X>

KIM S.; KIM D.; CHO S.W.; KIM J.; KIM J.S. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified *Cas9* ribonucleoproteins. **Genome Res.** 24(6):1012-9. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>

KUMAR S.; STECHER G.; LI M.; KNYAZ C.; TAMURA K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol.** 1;35(6):1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

LAVRINENKO K.; CHERNOUSOVA E.; GRIDNEVA E.; DUBININA G.; AKIMOV V.; KUEVER J.; LYSENKO A.; GRABOVICH M. (2010) *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int J Syst Evol Microbiol.**(Pt 12):2832-2837. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018853-0>

LIEBRENZ, K.; FRARE R.; GÓMEZ, C.; PASCUAN C.; BRAMBILLA S.; SOLDINI, D.; MAGUIRE V.; CARRIO A., RUIZ O.; MCCORMICK W, SOTO G.; AYUB N. (2022) Multiple ways to evade the bacteriostatic action of glyphosate in rhizobia include the mutation of the conserved serine 90 of the nitrogenase subunit *NifH* to alanine, **Research in Microbiology**, Volume 173, Issues 6–7, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103952>.

MAGALHÃES, F.M.M. (1981) Nitrogen fixing bacteria isolated from diverse soils and grass roots in Amazônia. In: VOSE, P. e RUSCHEL, A.P., eds. Associative N₂-Fixation. New York, CRC Press. p.39-48.

MATTHIES, D.; DALMAS, O.; BORGNA, M. J.; DOMINIK, P. K.; MERK, A.; RAO, P.; ... SUBRAMANIAM, S. (2016). Cryo-EM structures of the magnesium channel *CorA* reveal symmetry break upon gating. *Cell*, 164(4), 747–756. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.055>

MICHEL D.C.; PASSOS S.R.; SIMÕES-ARAÚJO J.L.; BARAÚNA A.C.; DA SILVA K.; *et al.* (2017). *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. **Archives of Microbiology**, 199:657–664.

MURRAY R.G.; SCHLEIFER K.H. (1994) Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. **Int J Syst Bacteriol**; 44:174-176.

MURRAY, R.G.E.; DOETSCH, R.N.; ROBINOW, C.F. (1994) **Determinative and cytological light microscopy**. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., and Krieg, N.R. (eds). Washington, DC, USA: **American Society for Microbiology**, pp. 21–41.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. (1995) The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology advances**, v. 13, n. 3, p. 415-424.

PARKS D.H.; IMELFORT M.; SKENNERTON C.T.; HUGENHOLTZ P.; TYSON G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates. single cells and metagenomes **Genome research**. 25; 1043–1055.

PARTE, A.C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; REIMER, L.C.; GÖKER, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70, 5607-5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>

RODRIGUEZ-R L.M.; KONSTANTINIDIS K.T. (2016). The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. [PeerJ Preprints 4:e1900v1](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw001).

RODRIGUEZ-R *et al.* (2018). The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic Acids Research* 46(W1):W282-W288. <https://doi.org/10.1093/nar/gky467>.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

RICHTER M.; ROSSELLÓ-MÓRA R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A*;106(45):19126-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>.

SPEROTTO, R.A.; GROSS, J.; VEDOY, C.; PASSAGLIA, L.M.P.; SCHRANK, I.S. (2004). The Electron Transfer Flavoprotein ABCX Gene Products from *Azospirillum brasilense* Show a *NifA*-Dependent Promoter. Regulation **Current Microbiology** Vol. 49 pp. 267–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4318-3>

TARRAND J.J.; KRIEG N.R.; DÖBEREINER J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can J Microbiol**; 24:967–980.

TIKHONOVA E.N.; GROUZDEV D.S.; KRAVCHENKO I.K. (2019). *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog. **Int J Syst Evol Microbiol**. 69:2787–2793.

VEGA C.F.; KEMMELMEIR K.; RUFINI M.; CARVALHO T.S.; MOREIRA F.M.S. (2020) Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Nutrition as Related to Soil Chemical and Physical Attributes and Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00235-9>

ZHAO, Z.; MING H.; DING, CHEN-LONG; ... NIE GUO-XING. (2020) *Azospirillum thermophilum* sp. nov., isolated from a hot spring. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, 70:550–554. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003788>

Apêndice C

Tabela S1 - Meio de cultura NFb modificado (MAGALHÃES, 1981), e meio de cultura batata.

Reagentes	Quantidades
Acido málico	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Manitol	0,5 g
Sacarose	0,5 g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,02 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
Solução de Micronutrientes	2,0 mL
FeEDTA Solução 1,64%	4,0 mL
Azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N Na OH)	2,0 mL
Agua destilada	1000 mL
pH	6,8
Agar (semi-sólido)	1,75 g
KOH	0,4 g

Ajustar o pH para 6,8 e completar o volume para 1000mL com água destilada. Adicionar 1,8 g de Agar para meio semi-sólido, e 17, 5 para meio sólido mais 0.2 g de extrato de levedura.

Solução de Micronutrientes		Solução de Vitaminas	
Reagente	Quantidade	Reagente	Quantidade
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O	0,2 g	Piridoxina	20,0 mg
Biotina	10,0 mg	H ₃ BO ₃	0,28 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,235 g	Agua Estéril	100,0 mL

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100mL com água destilada. Manter a solução em geladeira.

Meio de cultura batata

Reagentes	Quantidades
Batata	200g
Ácido málico	2,5g
Açúcar cristal	2,5g
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL
Azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N Na OH)	2 gotas

Pesar 200 g de batata inglesa, descascar e cozinhar durante 30 minutos em água destilada. Em seguida filtrar em funil com algodão. Em separado, misturar as quantidades do ácido málico e açúcar dissolvendo-os em água destilada até 50 mL, ajustando o pH para 6,8 com KOH (pastilhas). Adicionar no filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. Completar para 1000 mL com água destilada. Fonte: VEGA et al., 2020.

Tabela S2 – Similaridade entre as estirpes tipo mais próximas e a UFLA0325^T.

	16SRNA	recA	rpoD	gyrA	gryB	nifH	concatenada
<i>A. agrícola</i> (CC-HIH038 ^T)	99,22	96,63	98,70	97,26	98,89	X	97,17
<i>A. amazonense</i> (CBAmc ^T)	95,31	92,16	X	X	X	X	X
<i>A. baldaniorum</i> (Sp245 ^T)	98,82	97,11	96,96	X	95,19	X	84,50
<i>A. brasiliense</i> (ATCC_2914 ^T)	98,32	97,82	96,28	95,51	94,72	89,92	84,81
<i>A. canadense</i> (DS2 ^T)	96,53	X	X	X	X	X	X
<i>A. doebereineriae</i> (DSM13131 ^T)	98,21	95,39	94,86	95,42	93,59	97,63	93,88
<i>A. fermentarium</i> (CC-LY743 ^T)	98,91	X	X	X	X	X	X
<i>A. formosense</i> (CC-Nfb-7 ^T)	98,91	97,95	96,50	95,97	96,27	91,86	84,71
<i>A. griseum</i> (L-25-5 ^T)	97,89	X	92,71	93,61	88,99	X	89,22
<i>A. halopraeferens</i> (DSM3675 ^T)	98,91	98,49	97,39	98,80	97,26	93,33	81,48
<i>A. humicireducens</i> (SgZ-5 ^T)	98,91	88,43	90,34	95,22	89,43	91,75	87,81
<i>A. irakense</i> (DSM11586 ^T)	98,91	86,11	X	98,80	78,08	77,71	X
<i>A. largomobile</i> (UQM2041 ^T)	95,36	X	X	X	X	X	X
<i>A. lipoferum</i> (Sp59b ^T)	94,05	91,50	90,16	92,81	92,60	95,72	87,95
<i>A. melinis</i> (TMCY0552 ^T)	94,33	86,99	89,30	94,75	93,11	93,82	88,03
<i>A. oryzae</i> (AB185395 ^T)	96,66	86,06	91,25	90,83	92,01	90,40	89,10
<i>A. palustre</i> (KCTC_62613 ^T)	94,05	92,87	89,81	92,22	91,70	94,68	87,92
<i>A. picis</i> (IMMIB_TAR3 ^T)	98,14	95,67	93,52	93,93	93,03	90,58	89,41
<i>A. ramasamyi</i> (M2T2B2 ^T)	98,91	86,12	90,89	91,37	86,90	X	88,29
<i>A. rugosum</i> (DSM19657 ^T)	98,45	96,69	95,13	96,23	92,68	93,91	85,06
<i>A. soli</i> (C-LY788 ^T)	98,91	95,90	94,97	95,52	91,89	93,91	85,82
<i>A. thermophilum</i> (CFH_70021 ^T)	97,75	94,47	93,31	94,60	90,76	88,68	88,32
<i>A. thiophilum</i> (BV-S ^T)	98,32	90,93	90,67	93,92	89,17	93,82	87,68
<i>A. zeae</i> (N7 ^T)	97,11	X	X	X	X	X	X

Tabela S3 - Genes relacionados a fixação biológica de nitrogênio e estirpes mais próximas de referência.

Strain	Size	Number of features	Nitrogen Gene								
			<i>Nifs*</i>	<i>PtsN</i>	<i>Gln</i>	<i>NtrB</i>	<i>GlnG</i> (= <i>NtrC</i>)	<i>NtrY</i>	<i>Fixs*</i>	<i>PtsN</i>	<i>GlnK</i>
<i>Azospirillum_UFLA0325</i> ^T	7,646,905	6,562	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A._doebereinaerae_GSF71</i> ^T	6,989,987	6,494	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A._thiophilum_BV-S</i> ^T	7,609,458	6,89	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A._picis_IMMIB_TAR-3</i> ^T	7,015,440	6,563	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A._palustre_KCTC_62613</i> ^T	7,997,491	7,302	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**nifA*(Nitrogenase (molybdenum-iron)-specific transcriptional regulator-A; *nifB* -nitrogenase FeMo-cofactor synthesis FeS core scaffold and assembly protein-B; *nifE* - nitrogenase FeMo-cofactor scaffold and assembly protein-E; *nifH* nitrogenase (molybdenum-iron) reductase and maturation protein-H; *nifN* nitrogenase FeMo-cofactor scaffold and assembly protein-N; *nifO* -nitrogenase-associated protein-O; *nifQ* - nitrogenase FeMo-cofactor synthesis molybdenum delivery protein-Q; *nifX* - nitrogenase FeMo-cofactor carrier protein-X; *nifW*- nitrogenase stabilizing/ protective protein-W; *PtsN* (PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein), *GlnK* (Nitrogen regulatory protein P-II), *NtrB* (Nitrogen regulation protein), *GlnG=NtrC* (Nitrogen regulation protein NR(I)-G; Nitrogen regulatory protein P-II-K), *NtrK* (Nitrogen regulation protein/ Nitrogen assimilation regulatory protein), *FixAB* (Electron transfer flavoprotein, beta subunit-A, Electron transfer flavoprotein, alpha subunit - B, *fixC*Electron transfer flavoprotein-quinone oxidoreductase-C, *fixJ* Two-component nitrogen fixation transcriptional regulator-J, *fixL* two-component oxygen-sensor histidine kinase-L; Ferredoxin-like protein-X), *PtsN* (IIA-like nitrogen-regulatory protein), *GlnK* (Nitrogen regulatory protein P-II)

Tabela S4 - Genes relacionados com estresse ambiental encontrada em genoma e estirpes mais próximas de referência.

Strain	Size	Number of features	Resistance Gene								
			<i>CorA</i>	<i>CzcD</i>	<i>tehA</i>	<i>Bcr/CflA</i>	<i>Bcr</i>	<i>SMR</i>	<i>ACR3</i>	<i>ChoV</i>	<i>ProW</i>
<i>Azospirillum_UFLA0325</i> ^T	7,646,905	6,562	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A._doebereinae_GSF71</i> ^T	6,989,987	6,494	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>A._thiophilum_BV-S</i> ^T	7,609,458	6,89	+	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>A._picis_IMMIB_TAR-3</i> ^T	7,015,440	6,563	+	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>A._palustre_KCTC_62613</i> ^T	7,997,491	7,302	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Genes de Resistência: *CorA* (Magnesium and cobalt transport protein), *CzcD* (Cobalt/zinc/cadmium resistance protein), *tehA* (Tellurite resistance protein), *Bcr/CflA* (Multidrug resistance transporter), *Bcr* (MFS family multidrug efflux protein), *SMR* (Small multidrug resistance family protein), *ACR3* (Arsenical-resistance protein), *ChoV* (betaine/proline/choline family ABC transporter ATP-binding protein), *ProW* (Glycine betaine/L-proline transport system permease protein).

M.S1. Tutorial_r_studio

```
#library(phytools)
#library(tidyverse)
#library(adephylo)
#fastDist<-function(tree,sp1,sp2){
  fastHeight(tree,sp1,sp1)+fastHeight(tree,sp2,sp2)-
  2*fastHeight(tree,sp1,sp2)}
#tree <- read.newick(("gyrA.nwk"))
#distances <- distTips(tree, method = "patristic")
#write.table(as.matrix(distances)[, "Azospirillum_U0325.CDS.3648_gyrA_kbase"], "resultado_gyrA.txt")
```

ARTIGO IV - Descrição e anotação genômica de duas estirpes de *Azospirillum uflense* (UFLA0267^T) e *Azospirillum lavrensis* (UFLA0327^T) isoladas da rizosfera de *Pereskia aculeata* Mill.

Resumo

A análise do gene 16S rRNA confirmou que as estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T pertencem ao gênero *Azospirillum*, ambas mostrando um posicionamento próximo a espécie *A. brasilense* (DSM 1690^T), *A. baldaniorum* (BR11005^T) e *A. formosense* (CC-Nfb-7^T). A partir da filogenia dos genes housekeeping (*GyrA*, *GyrB*, *recA* e *rpoD*) observou-se que as estirpes formaram um grupo com as mesmas três espécies. O *Average nucleotide identity* (ANI) entre as estirpes desse estudo e as espécies Tipo mais próximas: *A. brasilense* (DSM 1690^T), *A. baldaniorum* (BR11005^T) e *A. formosense* (CC-Nfb-7^T) foram de 98,64%, 95,04% e 93,93% com a UFLA0267^T e 95%, 93,91% e 93,81% com a estirpe UFLA0327^T, respectivamente. Ambas as estirpes cresceram sob pH entre 5 e 9, todavia a UFLA0327^T se mostrou positiva para produção de índole (triptofano), fermentação (glucose), hidrólise (protease), glucose e diferentes fontes de carbono. Dessa forma e baseado nos dados, consideramos que as estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T representam novas espécies, cujo nomes *Azospirillum uflense* e *Azospirillum lavrensis* são propostos, nessa ordem.

Palavras-chave: Rizobactérias. Fixação biológica. Inoculação. Genoma.

Introdução

O gênero *Azospirillum*, faz parte da família *Rhodospirillaceae*, da classe *Alphaproteobacteria*, e foi proposto por Tarrand et al. (1978), pela primeira vez, para cepas fixadoras de nitrogênio associada à raiz, '*Spirillum lipoferum*'. Compreende bactérias gram-negativas, que aparecem como células vibrióides com flagelos polares e têm um conteúdo de DNA G + C de 69-71 mol% (FALK et al. 1985; ZHAO et al. 2020). São de vida-livre com um movimento vibratório ou semelhante a um saca-rolhas característico em meios líquidos por meio de flagelos polares (FALK et al. 1985), não formadora de esporos, capazes de crescer sob condições microaerofílicas e suas células são bastonetes ou em forma de espiral (FERREIRA et al., 2022). As espécies de *Azospirillum* são largamente distribuídas, especialmente em regiões de solos tropicais, subtropicais e regiões temperadas e estão frequentemente associadas com plantas como gramíneas e outras culturas (DÖBEREINER e DAY, 1976). Tendo sido relatado como Microrganismo Promotor de Crescimento de Plantas (MPCP) pela produção de

fitohormônios, os representantes desse gênero são cosmopolitas e colonizam uma ampla variedade de habitats, incluindo diversos ambientes, sobretudo associados a raízes de plantas.

No momento de escrita desse trabalho, encontramos 28 espécies em publicações válidas e seus nomes registrados na lista de nomes procarióticos com *Standing in Nomenclature* (<https://www.bacterio.net/>) (EUZÉBYY, 1997; PARTE, 2020). Baseados em análises fenotípicas e estudo filogenético do genoma, estas cepas representam novas espécies do gênero *Azospirillum*, e as espécies mais próximas das nossas cepas são: *A. brasilense* (DSM 1690^T), *A. baldaniorum* (BR11005^T) e *A. formosense* (CC-Nfb-7^T).

Material e Métodos

Origem das estirpes

O isolamento das estirpes diazotróficas foram realizados a partir raiz sem lavar (com remoção do solo aderido) e macerado das raízes lavadas em água. Para o isolamento da estirpe UFLA0267^T, foi seccionado um fragmento fino de raiz de aproximadamente 1 cm de comprimento e com ajuda de uma pinça foi introduzido no meio de cultura Nfb semi-sólido (DÖBEREINER et al., 1995) reduzido o ácido málico para 0,5g L⁻¹ e acrescido a mesma quantidade de manitol e sacarose (MAGALHÃES, 1981). Para o isolamento da UFLA0327^T, foi extraída uma alíquota de 0,1 ml do macerado de raiz em água e introduzido no meio de cultura semi-sólido Nfb modificado.

A estirpe UFLA0267^T foi isolada do município de Ijaci (21° 10' 36.86'' S; 44° 55' 40.18'' O), Minas Gerais, 823 m de altitude, e possui característica da colônia convexa, moderada, gomosa e brilhante. A estirpe UFLA0327^T foi isolada do mesmo município, coordenadas (21° 10' 20.79'' S; 44° 55' 37.20'' O) com altitude de 839 m. Apresenta características de colônia: convexa, pouca, abundante e opaco. Controles negativos ou brancos foram utilizados para avaliar a ausência de contaminação no meio. A estirpe UFLA0246 (*Azospirillum brasilense*) foi utilizada como controle positivo para a validação do meio, quanto à formação da película, indicativa da presença de bactérias diazotróficas. Para conservação e armazenamento, os isolados foram colocados em água destilada esterilizada à temperatura ambiente e também liofilizados.

Sequenciamento do genoma

Para obter as sequências genômicas de uma linhagem, estas foram cultivadas em meio de cultura líquido NFb modificado (MAGALHÃES, 1981) durante 2-3 dias. Depois disso, uma alíquota de 1 mL deste meio foi transferida para microtubos para seguir com o protocolo de extração de DNA do kit de purificação de DNA genômico Wizard®. A preparação da biblioteca de DNA genômico foi realizada utilizando o kit de biblioteca NexteraXT (Illumina, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. KAPA SYBR® FAST qPCR com QuantStudio ® 5 System (Applied Biosystems, California, USA) foi utilizado para medir a quantidade final da biblioteca. A qualidade da biblioteca foi avaliada pela TapeStation HSD1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, EUA). Com base em valores de CQ, realizamos um pooling equimolar de bibliotecas, e leituras de pares (2X150 bases) foram sequenciadas no Illumina® HiSeq X (Illumina, Califórnia, EUA) com uma configuração de comprimento de leitura de 150 PE para leituras de 1,6 M PE (0,8M em cada direção) por amostra. A montagem das estirpes realizada utilizando SPADes 3.13.0 (BANKEVICH et al. 2012). A qualidade e integralidade dos genomas verificadas com CheckM 1.0.18 (PARKS et al. 2015). A anotação dos genes feita com RAST (AZIZ et al. 2008). Todas estas análises foram realizadas utilizando a plataforma Kbase (<https://www.kbase.us/>).

Análise filogenética

Análise de similaridade (ANI) do genoma sequenciado foi realizada com 25 genomas intimamente relacionados com espécies de *Azospirillum* descritas, utilizando o FastANI v.0.1.3 (FastANI module and source code: <https://github.com/ParBLiSS/FastANI>), pela plataforma Kbase, para verificar a similaridade entre as estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T e o banco de dados das estirpes de referência e já descritas (> = 95% ANI). Posteriormente geramos também a matrix ANI/AAI de similaridade pelo Kostas (<http://enve-omics.ce.gatech.edu>) (RODRIGUEZ-R e KONSTANTINIDIS, 2016).

As estirpes consideradas para a comparação foram identificadas na página de referências do bacterio (<https://www.bacterio.net> acesso: 04 de fevereiro, 2023) considerando apenas as estirpes publicadas validamente na CIPE (Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos) (HORDT et al., 2020). O algoritmo de alinhamento múltiplo MUSCLE (EDGAR, 2004) foi usado para alinhar as sequências. As árvores filogenéticas foram construídas no software MEGA Versão 11.0.10 pelo método de

união de vizinhos (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) com bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 replicações, utilizando o algoritmo *maximum-likelihood* (KUMAR, STECHER, e TAMURA, 2018).

A sequência de 16s rRNA das estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T foram extraídas pelo Miga (<http://microbial-genomes.org/>) e as sequências das estirpes Tipo foram extraídas do banco de dados de nucleotídeos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), desconsiderando as estirpes não-cultiváveis, o *Query Cover* acima de 98% e percentual de identificação maior que 96,60%. Além de apenas aquelas publicadas validamente na CIPE e com nome correto, segundo o banco de dados do bacterio (<https://www.bacterio.net/>). Foram alinhadas com Muscle em Mega X (KUMAR, STECHER e TAMURA, 2018). A árvore de 16S rRNA (Figura 2) com 1214 pares de bases mostrou que as cepas *A. brasilense* (DSM 1690^T), *A. baldaniorum* (BR11005^T) e *A. formosense* (CC-Nfb-7^T), apresentaram maior similaridade com a estirpe, utilizando o modelo Kimura 2-parameter (K2+G+I). A estirpe *Bosea thioxidans* (DSM 9653^T) foi utilizada como um grupo externo e os valores de bootstrap (> 50%) com base em 1000 replicações são representados nos nós de ramificação. A qualidade das sequências 16S rRNA das estirpes foi verificada na base de dados Silva (www.arb-silva.de).

A sequência de 16s rRNA das estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T foram extraídas pelo Miga (<http://microbial-genomes.org/>) e as sequências das estirpes tipo foram extraídas do banco de dados de nucleotídeos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Foram alinhadas com Muscle em Mega X (KUMAR, STECHER, e TAMURA, 2018). A árvore de rRNA 16S (Fig. 3), com 1214 pares de bases, mostrou que as cepas *A. brasilense* (DSM 1690^T), *A. baldaniorum* (BR11005^T) e *A. formosense* (CC-Nfb-7^T) apresentaram maior similaridade com as estirpes, utilizando o modelo Tamura-Nei (TN93). Análise de similaridade (ANI) do genoma sequenciado com 22 genomas intimamente relacionados foi realizada com espécies de *Azospirillum* descritas utilizando o FastANI v.0.1.3 (FastANI module and source code: <https://github.com/ParBLiSS/FastANI>), pela plataforma Kbase, para compararmos nossa estirpe com as de referência e já descritas, apresnetando um ANI maior ou igual a 95% podemos constatar se tratar possivelmente de uma nova espécie.

O algoritmo de alinhamento múltiplo MUSCLE (EDGAR, 2004) foi usado para alinhar as sequências. As árvores filogenéticas foram construídas no software MEGA Versão 11.0.10 (2021) pelo método de união de vizinhos (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) com bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 replicações, utilizando o algoritmo

maximum-likelihood (KUMAR, STECHER e TAMURA, 2016). A concatenação de genes de manutenção foi realizada por Seaview 4.2.

Comparação genômica entre as estirpes

As estirpes foram analisadas utilizando o MALVE (DARLING et al., 2022) em que observamos blocos de mesma cor em posições diferentes em cada genoma (Fig. 2). O genoma de cima é da UFLA0267^T e o de baixo é da UFLA0327^T. Essa última está com duas linhas, porque provavelmente alinhou inversamente ao genoma da estirpe UFLA0267^T. A análise apresentou ainda um número de contigs de 557pb, o SNP de 26655 e percentual de bases perdidas de 8,08%.

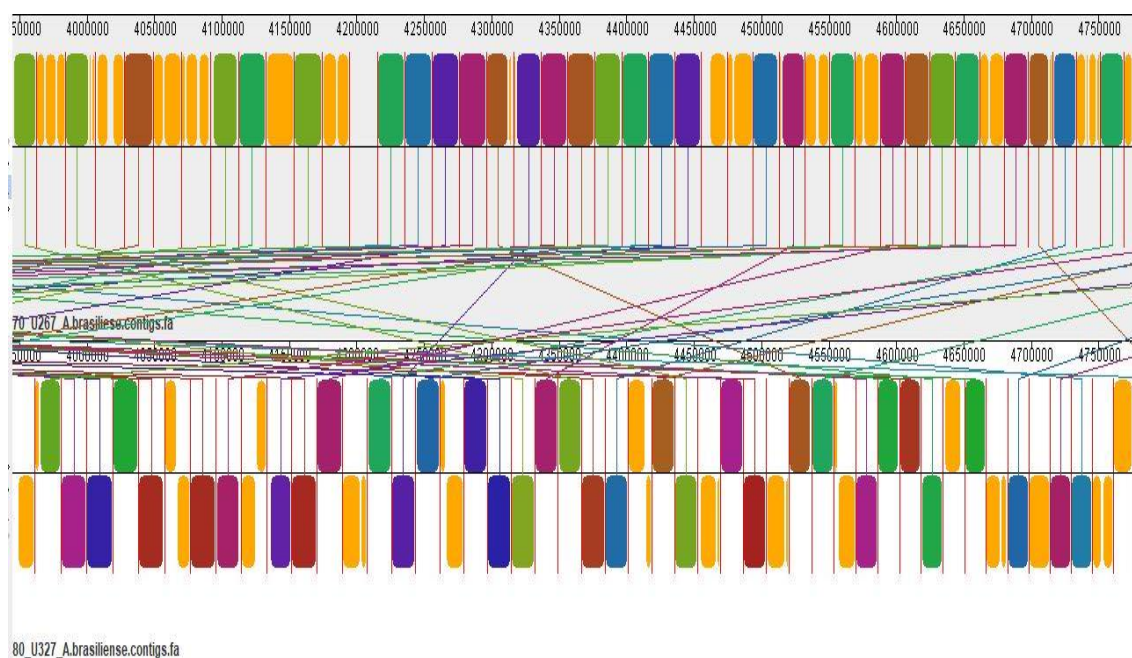


Figura 1. Resultado da comparação entre as duas estirpes do estudo (UFLA0267^T e UFLA0327^T) utilizando o visualizador de rearranjo Mauve.

Caracterização morfológica, fisiológica e fenotípica

Para determinar a capacidade de fixação de nitrogênio os isolados foram incubados em meio de cultura NFb semi-sólido livre de nitrogênio e confirmada pela formação de película na superfície e *A. brasilense* sp7^T, como um positivo controle. Para a caracterização morfológica, os isolados puros ficaram incubados por quatro dias em câmara de crescimento à 28 °C em meio de cultura batata dextrose (BDA). As características das colônias avaliadas foram: tempo de crescimento, diâmetro médio (mm), forma (puntiforme, circular e irregular), borda (inteira, ondulada, lobada, denteada e filamentosa), superfície (lisa, rugosa e papilada), produção de goma (escassa,

pouca, moderada e abundante), elevação (plana, lenticular, convexa e umbilicada), consistência da massa de crescimento (seca, aquosa, gomosa, viscosa e butírica), e detalhes ópticos (transparente, translucido, opaco e brilhante). Para conservação e armazenamento, os isolados foram colocados em água destilada esterilizada à temperatura ambiente e também liofilizados.

A coloração de gram foi realizada como descrito por Murray, Doestsch e Robinow (1994). A atividade da catalase foi examinada pela adição de 5% (v / v) solução de H₂O₂ para as colônias. Incubações em várias temperaturas foram feitas sob condições estáticas em meio NFb modificado (MAGALHÃES, 1981), semi-sólido em 15, 20, 25, 28, 30, 37, 40 e 45 °C. A faixa de pH de crescimento foi determinado no mesmo meio líquido (BALDANI et al. 1986) e sólido com pH final de 3 a 9 com um incremento de 0,5. HCl a 1% foi usado para ajustar o pH de 3 a 5, KOH 10% foi usado para pH 6 a 9. A tolerância ao sal foi testada no mesmo meio contendo 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 e 3,5 (p / v) de NaCl.

A resistência à antibióticos foi testada por difusão em discos (Kasvi) sob meio NFb sólido quanto a presença de ácido nalidixico (30 mcg), amicacina (30 mcg), amoxicilina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), azitromicina (15 mcg), aztreonam (30 mcg), cefuroxima (30 mcg), claritromicina (15 mcg), cloranfenicol (30 mcg), doxiciclina (30 mcg), eritromicina (15 mcg), estreptomicina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), lincomicina (2 mcg), neomicina (30 mcg), oxalina (1 mcg), penicilina (10 UI), polimixina (300 UI), rifamicina (5 mcg), sulfonamida (300 mcg), tetraciclina (30 mcg) e vancomicina (30 mcg) como descrito por Bauer et al. (1996).

A redução de nitrato a nitrito e nitrato a nitrogênio (N₂), produção de indol, análises de perfis de atividade enzimática como fermentation (glucose), arginine dihydrolase, hidrólise da urease, produção de índol (tryptophane), B-glucosidase (esculin), protease (gelatin), B-galactosidade (para-nitrophenyl-BD-galactopyranosidase), cytochrome oxidase e a utilização das fontes de carbono: glucose, arabinose, manose, manitol, n-acetyl-glucosamine, maltose, potassium gluconate, caproc acid, adipic acid, malate, trisodium citrate, phenylacetic acid foram testadas usando Kit API 20 NE (bioM erieux) a 28 °C de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados e discussão

Os genomas das estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T possuem 7.012.522 *bp* com contaminação de 3,29 e 7.001.315 *bp* com uma contaminação de 2,63, respectivamente.

Conforme a matrix ANI/AAI de similaridade (Tabela 1) elaborada na plataforma Kostas (<http://enve-omics.ce.gatech.edu>) o valor observado foi de 98,62 entre ambas as espécies (Tab. 1), mas ainda dessa forma damos seguimento como espécies distintas. Considerando a estirpe UFLA0267^T em relação a *A. baldaniorum* (Sp245^T) o valor referência de ANI foi 95,04, seguida da estirpe *A. brasilense* (ATCC 29145^T) com ANI de 93,93. O valor observado de ANI para a estirpe UFLA0327^T foi de 95,00 em relação a estirpe *A. baldaniorum* (Sp245^T) e 93,91 em relação a estirpe *A. brasilense* (ATCC29145^T).

Tabela 1. Matriz mostrando a porcentagem de semelhança de nucleotídeos aos pares das sequências completas entre a cepa U0267^T, U0327^T e as cepas tipo de referência das espécies mais próximas; os números de acesso são dados entre parênteses.

Estirpe	ANIm with strain					
	2	3	4	5	6	7
1. <i>Azospirillum</i> _U0267 ^T	98,64	95,04	93,93	93,80	84.83	83.93
2. <i>Azospirillum</i> _U0327 ^T		95,00	93,91	93,81	84.90	83.96
3. <i>A. baldaniorum</i> _Sp245 ^T			93,91	94.02	84.84	84.08
4. <i>A. brasilense</i> _ATCC_29145 ^T				94.39	84.77	84.00
5. <i>A. formosense</i> _CC-Nfb-7 ^T					84.99	84.15
6. <i>A. rugosum</i> _IMMIB_AFH-6 ^T						84.45
7. <i>A. soli</i> _CC-Ly788 ^T						100

As 23 espécies tipo de *Azospirillum* disponível foram baixadas do Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram incluídos na análise filogenética e os números de acesso encontrados na tabela S1. As estirpes selecionadas foram identificadas na página de referências do bacterio (<https://www.bacterio.net/>) considerando apenas as estirpes publicadas validamente na CIPE (Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos). As estirpes *Candidatus Azospirillum massiliense*, *A. largomobile*, *A. oleiclasticum*, *A. palatum*, *A. tabaci* não foram consideradas para esse estudo. E as estirpes *A. amazonense*, *A. argentinense*, *A. canadense*, *A. cavernae*, *A. fermentarium*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. zae* não foram encontrados algum gene *housekeeping* e se mostraram distantes na árvore 16S. Portanto não foram incluídas no estudo com o objetivo de obtermos dados mais consolidados.

A árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) baseada em sequências do gene 16S rRNA extraída do genoma foi reconstruídas usando Mega 10 (Fig. S1). A distância evolutiva foi calculada usando o modelo Tamura-Nei (TN93), que foi o de melhor ajuste. Nossa comparação da sequência de rDNA 16S confirmou que a cepa

UFLA0267^T e UFLA0327^T pertencem ao gênero *Azospirillum*. A filogenia do gene 16S rRNA indicou uma similaridade maior entre as nossas estirpes e *A. brasilense* (DSM 1690^T), seguida das estirpes *A. formosense* (CC-Nfb-7^T) e *A. baldaniorum* (BR11005^T) permanecendo no mesmo clado na árvore.

A análise filogenética baseada em quatro genes parciais concatenados (*GyrA*, *GyrB*, *recA* e *rpoD*) de dezoito estirpes e a árvore filogenômica indicou que UFLA0267^T e UFLA0327^T pertencem a linhagem *Azospirillum* sp., e distinta de qualquer espécie conhecida do gênero e entre si. A árvore concatenada das subunidades beta girase (*gyrA* e *gyrB*), subunidade recombinase (*recA*) e genes parciais do fator 70 sigma (*rpoD*), são apresentados na figura S2. A árvore destes quatro genes foram construídas como descrito em Mulet et al. (2010). Os parâmetros utilizados para cada um dos genes housekeeping: *gyrA* com 2700pb e *gyrB* com 2578pb, *nifH* com 877 pb, *recA* com 1083 pb; *rpoD* com 867 pb utilizando do modelo General Time Reverse - TR (Anexos S2). Para a árvore concatenada utilizamos o software Seaview e obtivemos um total de 7828 pb e utilizando o modelo GTR.

A estirpe *Azospirillum* UFLA0267^T apresentou uma similaridade dos genes *housekeeping* concatenados de 99,68% e o gene 16s rRNA de 99,92% em relação a estirpe UFLA0327^T. A mesma estirpe apresentou uma similaridade dos genes *housekeeping* de 97,61% com a estirpe *A. brasilense* DSM 1690^T e 97,57% com a estirpe *A. baldaniorum* BR 11005^T. A estirpe UFLA0327^T, em relação a UFLA0267^T apresentou similaridade de 99,68% entre os genes concatenados, enquanto que para o gene 16s rRNA foi de 99,92%. As estirpes mais próximas foram também *A. brasilense* DSM 1690^T, com similaridade de 97,58% e *A. baldaniorum* BR 11005^T, com uma similaridade de 97,54%.

Análises fenotípicas

Em relação aos testes conduzidos em laboratório foi observado que as estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T cresceram em temperaturas mais elevadas, de 40°C, que as descritas para as estirpes mais próximas: *A. baldaniorum* e *A. formosense*, 38°C e 37°C, respectivamente. A UFLA0267^T tolerou teores mais elevados de NaCl, 3,5%, valor superior aos encontrados para UFLA0327^T (2,5%) e *A. formosense* (2%).

Tabela 2. Características que diferenciam as estirpes U0267^T e U0327^T de suas espécies relacionadas mais próximas: *A. baldaniaron* sp. (Sp245) e *A. formosense* (CC-NFb-7) utilizando de testes em laboratório e kit API20 NE.

Testes	U0267 ^T	U0327 ^T	<i>A. baldaniorum</i> ¹ sp. Sp245	<i>A. formosense</i> ² CC-NFb-7
Temperatura de crescimento	20-40°C	15-40°C	20-38°C	20-37°C
pH	5,0-9,0	5,0-9,0	5,0-9,14	5,0-9,0
Tolerância a NaCl (%)	0,5-3,5	0,5-2,5	0 -3	0 - 2
Redução de nitrato	+	-	+	+
Produção de indol (TRyptophane)	-	+	+	+
Fermentação (GLUcose)	-	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	ND	ND
Urease	+	+	-	-
Hydrolysis (B-glucosidade) (Esculin)	+	+	+	+
Hydrolysis (Protease) (Gelatin)	-	+	-	-
B-galactosidade (Para-NitroPhenyl-BD-Galactopyranosidase)	+	+	-	+
<i>Fontes de carbono</i>				
Glucose	-	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+
Manose	-	+	+	+
Manitol	-	+	+	+
N-acetyl-Glucosamine	-	+	ND	ND
Maltose	-	+	ND	-
Gluconato de potássio	+	+	ND	+
Ácido caprico	-	-	ND	ND
Ácido adipico	-	-	ND	ND
MalaTe	+	+	ND	ND
Trisodium citrate	-	+	ND	ND
Phenylacetic acid	-	-	ND	ND
DNA G+C (%)	68,37	68,26	68,4	68,6

¹Ferreira et al. (2020); ²Lin et al. (2012). ND = unidentified.

A estirpe U0267^T se mostrou susceptível aos antibióticos: ácido nalidíxico, amicacina, azitromicina, cloranfenicol, doxiciclina, streptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, rifamicina, sulfonamides e tetraciclina; e resistente a amoxicilina, ampicilina, aztreonam, cefuroxima, claritromicina, eritromicina, lincomicina, oxacilina, penicilina, polimixina e vancomicina. A estirpe UFLA0327^T apresentou-se resistência à amicacina, eritromicina e lincomicina, para todos os demais antibióticos foram susceptíveis.

Descrição das espécies

Gram-negativa, oxidase e catalase-positiva, a UFLA0267^T possui colônias convexas, gomosa e brilhante em meio NFb modificado e 4-6 mm de diâmetro após 48 h. Aeróbica. O crescimento ocorre com 0-2,5% (p/v) NaCl (ótimo 1,5%), em pH 5,0-9,0 (ótimo 6,5) e 15–40 °C (ótimo 30 C). Com API 20 NE (bioMerieux) essa estirpe apresentou redução de nitrato, Arginine DiHydrolase, urease, hidrolise (B-glucosidade e B-galactosidade), arabinose, maltose, malato, gluconato de potássio. A UFLA0327^T, gram-negativa, e catalase positiva possui colônia convexa, pouca, abundante e opaco. O crescimento ocorre com 0-1,5% (p/v) NaCl (ótimo 1,0%), em pH 5,5-9,0 (ótimo 6,5) e 15–37 °C (ótimo 30 C). Positiva para produção indol, fermentação, Arginine DiHydrolase, urease, hydrolase (B-glucosidade e protease), B-galactosidade e fontes de carbono como glucose, arabinose, manose, manitol, n-acetyl-glucosamine, maltose e gluconato de potássio, malato e citrato trisódico. A estirpe UFLA0267^T apresentou resistência a amoxicilina, ampicilina, aztreonam, cefuroxima, claritrommicina, eritromicina, lincomicina, oxacilina, penicilina, polimixina e vancomicina e a estirpe UFLA0327^T à amicacina, eritromicina e lincomicina, para todos os demais antibióticos foram susceptíveis. Com base em dados morfológicos, quimiotaxonômicos e fisiológicos, as estirpes UFLA0267^T e UFLA0327^T apresentam duas novas espécie do gênero *Azospirillum*, dentre as estirpes tipo e entre si, para o qual os nomes *Azospirillum uflense* sp. e *Azospirillum lavrensis* sp. são propostos respectivamente

REFERÊNCIAS

- AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A. *et al.* (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics** 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- BANKEVICH, A.; NURK, N.; ANTIPOV, D.; ALEXEY A. GUREVICH, MIKHAIL D.; ALEXANDER S.; KULIKOV, V. M.; LESIN, S. I.; NIKOLENKO, S. P.; ANDREY D. P.; ALEXEY V. P.; ALEXANDER V. S.; NIKOLAY V., GLENN T.; MAX A. A.; PAVEL A. P. (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, 455-77. <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- BAUER A.W.; KIRBY W.M.; SHERRIS J.C.; TURCK M. (1996) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol.** 1966 Apr;45(4):493-6. PMID: 5325707.
- DARLING, A C.E.; MAU, B; BRATTNER, F.R.; PERNA, N.T. (2022). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements. **Genome Research**, jan. 2022. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2289704>
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. (1976). Simbioses associativas em gramíneas tropicais: caracterização de microrganismos e sítios de fixação de dinitrogênio. **Anais do Primeiro Simpósio Internacional sobre N₂ Fixação**, págs. 518–538. Editado por WE Newton e CJ Nyman. Pullman: Washington State University Press.
- EDGAR R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, **Nucleic Acids Research**, Volume 32, Issue 5, 1, P. 1792–1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- EUZÉBY, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, 590-592; <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>
- FALK E.C.; DÖBEREINER J.; JOHNSON J.L.; KRIEG N.R. (1985) Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães et al. 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 1985; 35:117-118.
- FELSENSTEIN, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal Mol Evol** 17, 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- FELSENSTEIN, J. (1985) “Phylogenies and the Comparative Method.” **The American Naturalist** 125, no. 1: 1–15. <http://www.jstor.org/stable/2461605>.
- FERREIRA, N. S.; et al. (2020) Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 70.12: 6203-6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>

FERREIRA, N. S. *et al.* (2022) Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 005475.

KUMAR S.; STECHER G.; LI M.; KNYAZ C.; TAMURA K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol.** 35(6):1547-1549. PMID: 29722887; PMCID: PMC5967553. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol.**33(7):1870-4.: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LAVRINENKO, Ksenia *et al.* (2010) *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2832-2837.

LIN, SHIH-YAO *et al.* *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt_5, p. 1185-1190, 2012.

MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. **Environ. Microbiol.** 12, 1513–1530.

PARKS D.H.; IMELFORT M.; SKENNERTON C.T.; HUGENHOLTZ P.; TYSON G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Res.** 25(7):1043-55. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.

PARTE, A.C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; REIMER, L.C.; GÖKER, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70, 5607-5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>

HORDT A. *et al.* (2020) Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of *Alphaproteobacteria*. **Front Microbiol**; 11:468.

RODRIGUEZ-R L.M.; KONSTANTINIDIS K.T. (2016). The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. [PeerJ Preprints 4:e1900v1](https://doi.org/10.1101/061111).

SAITOU, N.; NEI, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, Center for Demographic and Population Genetics, University of Texas Health Science Center, Houston 77225, v 4, n 4, p. 406-425, ISSN 0737-4038. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/4/4/406.abstract>

TARRAND J.J.; KRIEG N.R.; DÖBEREINER J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can J Microbiol**, 24:967–980.

ZHAO, Z.; MING H.; DING, CHEN-LONG, ... NIE GUO-XING. (2020) *Azospirillum thermophilum* sp. nov., isolated from a hot spring. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, 70:550–554
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003788>.

Apêndice D

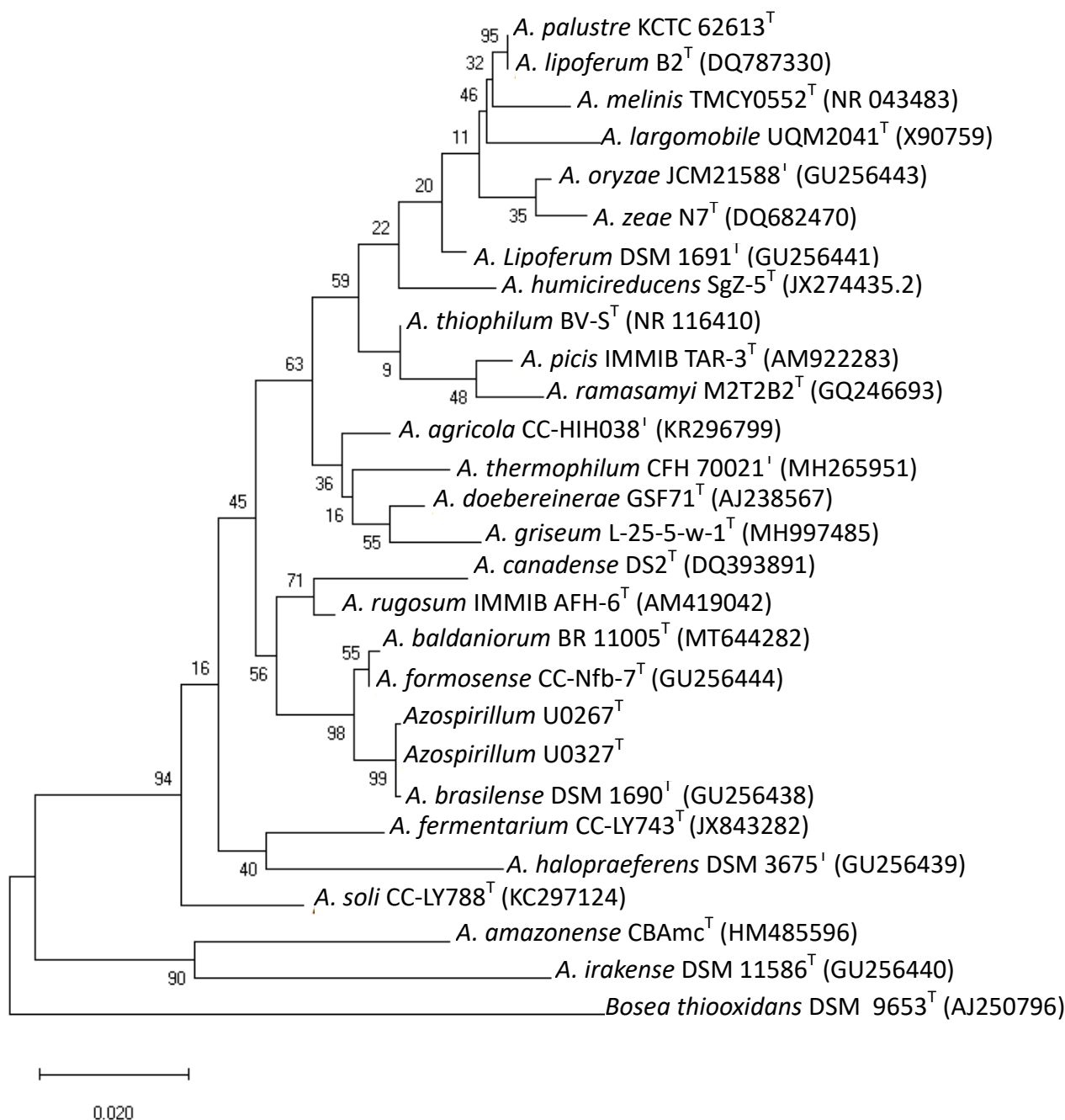


Figura S1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada em sequências do gene 16S rRNA (1381 posições de nucleotídeos no conjunto de dados final). A árvore mostra a posição filogenética das cepas U267 e U327 e as espécies mais estreitamente relacionadas. Os valores de bootstrap (> 50%) com base em 1000 replicações são representados nos nós de ramificação. *Bosea thiooxidans* (DSM 9653^T) foi usado como um grupo externo. Identificadores do genoma das sequências do gene 16S rRNA usadas são fornecidas entre parênteses.

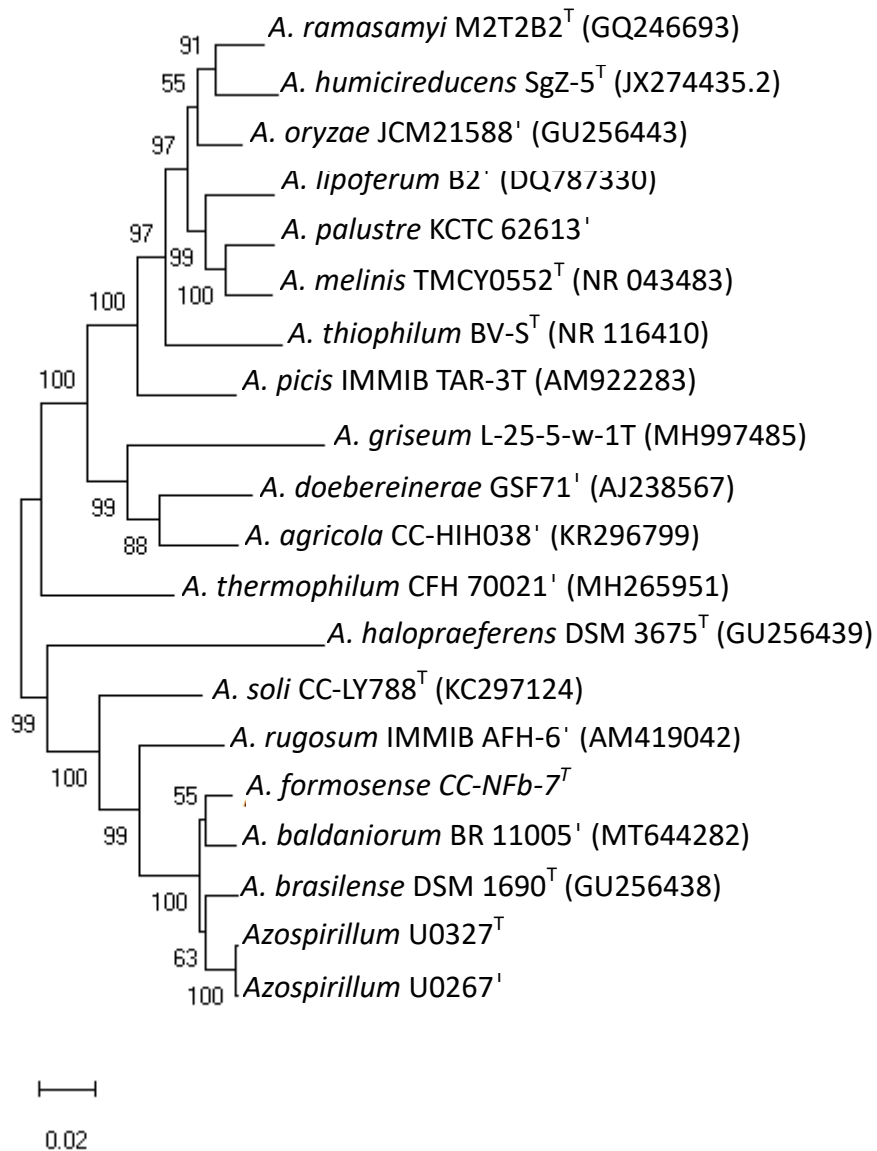


Figura S2. Árvore filogenética concatenada com base nas sequências dos genes *gyrA*, *gyrB*, *recA* e *rpoD* mostrando as relações entre a nova cepa e as espécies tipo (T) do gênero *Azospirillum* com Maximum-Likelihood utilizando o modelo Tamura-Nei (TN93). Os valores de bootstrap foram inferidos de 1000 replicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Os números de acesso do GenBank são fornecidos entre parênteses.

Tabela S1. Nomes das estirpes tipo válidas e em consonância com Hordt et al. (2020). Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/azospirillum>

Name	Nomenclatural status	Taxonomic status
Azospirillum agricola Lin et al. 2016	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum argentinense Dos Santos Ferreira et al. 2022	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum baldaniorum Dos Santos Ferreira et al. 2020	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum brasilense corrig. Tarrand et al. 1979 (Approved Lists 1980)	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum canadense Mehnaz et al. 2007	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum cavernae Zhu et al. 2022	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum doebereineriae Eckert et al. 2001	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum fermentarium Lin et al. 2013	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum formosense Lin et al. 2012	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum griseum Yang et al. 2019	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum halopraeferens Reinhold et al. 1987	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum humicireducens Zhou et al. 2013	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum largimobile corrig. (Skerman et al. 1983) Ben Dekhil et al. 1997	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum lipoferum (Beijerinck 1925) Tarrand et al. 1979 (Approved Lists 1980)	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum melinis Peng et al. 2006	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum oryzae Xie and Yokota 2005	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum palustre Tikhonova et al. 2019	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum picis Lin et al. 2009	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum ramasamyi Anandham et al. 2019	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum rugosum Young et al. 2008	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum soli Lin et al. 2015	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum thermophilum Zhao et al. 2020	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum thiophilum Lavrinenko et al. 2010	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum zea Mehnaz et al. 2007	validly published under the ICNP correct name	
Azospirillum brasiliense Tarrand et al. 1979 (Approved Lists 1980)	inaccurate spelling	misspelling
Azospirillum largomobile (Skerman et al. 1983) Ben Dekhil et al. 1997	inaccurate spelling	misspelling
"Candidatus Azospirillum massiliensis" Pagnier et al. 2008	inaccurate spelling	
Azospirillum irakense Khammas et al. 1991	validly published under the ICNP synonym	
Azospirillum amazonense Magalhães et al. 1984	validly published under the ICNP synonym	
"Candidatus Azospirillum massiliense" corrig. Pagnier et al. 2008	not validly published	
"Azospirillum oleiclasticum" Wu et al. 2020	not validly published	
"Azospirillum palatum" Zhou et al. 2009	not validly published	
"Azospirillum tabaci" Duan et al. 2021	not validly published	

Tabela S2. Similaridade entre as estirpes tipo para cada gene housekeep em relação a UFLA0267^T.

Estirpes	16S rRNA	gyrA	gryB	recA	rpoD	concatenada
<i>Azospirillum</i> U0267 ^T	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Azospirillum</i> U0327 ^T	99,92	99,74	98,54	99,72	99,65	99,68
<i>A. agricola</i> CC-HIH038 ^T (KR296799)	99,25	88,22	-30,29	98,89	50,38	88,53
<i>A. baldaniorum</i> BR 11005 ^T (MT644282)	99,72	96,77	-47,87	98,03	52,54	97,57
<i>A. brasilense</i> DSM 1690 ^T (GU256438)	99,85	97,32	-47,56	98,37	52,03	97,61
<i>A. doebereineriae</i> GSF71 ^T (AJ238567)	99,89	87,64	-34,29	94,93	48,37	88,01
<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7 ^T (GU256444)	99,82	96,84	-48,65	98,48	52,20	97,59
<i>A. griseum</i> L-25-5w-1 ^T (MH997485)	98,72	86,78	-38,51	98,89	46,79	86,06
<i>A. halopraeferens</i> DSM 3675 ^T (GU256439)	99,89	84,52	-30,29	92,60	52,87	85,49
<i>A. humicireducens</i> SgZ-5 ^T (JX274435)	98,42	89,15	-30,29	92,21	45,00	87,88
<i>A. lipoferum</i> 59b ^T (NZ VTTN01000018)	93,49	87,05	-34,84	95,29	44,86	87,70
<i>A. melinis</i> TMCY 0552 ^T (NR 043483)	93,77	88,66	-34,45	90,76	44,21	88,05
<i>A. oryzae</i> JCM 21588 ^T (GU256443)	96,92	88,57	-124,34	89,88	45,69	88,60
<i>A. picis</i> IMMIB TAR-3 ^T (AM922283)	99,09	87,87	-35,12	98,89	47,42	88,11
<i>A. ramasamyi</i> M2T2B2 ^T (GQ246693)	99,89	89,11	-35,56	88,07	45,42	88,29
<i>A. rugosum</i> IMMIB AFH-6 ^T (AM419042)	99,42	94,14	-43,76	97,37	52,87	93,76
<i>A. soli</i> CC-LY788 ^T (KC297124)	99,89	92,30	-38,12	96,64	52,87	92,31
<i>A. thermophilum</i> CFH 70021 ^T (MH265951)	98,81	89,73	-36,80	95,30	49,76	89,09
<i>A. thiophilum</i> BV-S ^T (NR 116410)	99,89	87,88	-36,43	94,58	45,25	86,99
<i>A. palustre</i> B2 ^T (DQ787330)	93,49	87,82	-35,70	96,43	44,59	88,00

Tabela S3. Similaridade entre as estirpes tipo para cada gene housekeep em relação a UFLA0327^T.

Estirpes	16S rRNA	gryA	gryB	recA	rpoD	concatenada
<i>Azospirillum</i> U0327 ^T	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Azospirillum</i> U0267 ^T	99,92	99,74	98,54	99,72	99,65	99,68
<i>A. agricola</i> CC-HIH038 ^T (KR296799)	99,30	88,29	-31,75	98,99	50,25	88,50
<i>A. amazonense</i> CBAmc ^T (HM485596)	96,34					
<i>A. baldaniorum</i> BR 11005 ^T (MT644282)	99,77	96,84	-49,34	98,13	52,41	97,54
<i>A. brasilense</i> DSM 1690 ^T (GU256438)	99,90	97,39	-49,02	98,47	51,90	97,58
<i>A. canadense</i> DS2 ^T (DQ393891)	97,56					
<i>A. doebereineriae</i> GSF71 ^T (AJ238567)	99,94	87,71	-35,75	95,02	48,25	87,99
<i>A. fermentarium</i> CC-LY743 ^T (JX843282)	99,94					
<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7 ^T (GU256444)	99,86	96,91	-50,11	98,58	52,08	97,56
<i>A. griseum</i> L-25-5w-1 ^T (MH997485)	98,77	86,85	-39,97	98,99	46,66	86,03
<i>A. halopraeferens</i> DSM 3675 ^T (GU256439)	99,94	84,59	-31,75	92,70	52,74	85,46
<i>A. humicireducens</i> SgZ-5 ^T (JX274435)	98,47	89,22	-31,75	92,31	44,87	87,85
<i>A. irakense</i> DSM 11586 ^T (GU256440)	99,94					
<i>A. largomobile</i> UQM 2041 ^T (X90759)	94,85					
<i>A. lipoferum</i> 59b ^T (NZ VTTN01000018)	96,61	87,12	-36,30	95,39	44,73	87,67
<i>A. melinis</i> TMCY 0552 ^T (NR 043483)	93,82	88,73	-35,92	90,86	44,08	88,02
<i>A. oryzae</i> JCM 21588 ^T (GU256443)	96,97	88,64	-125,81	89,98	45,56	88,58
<i>A. palustre</i> B2 ^T (DQ787330)	93,54	87,89	-37,16	96,53	44,46	87,97
<i>A. picis</i> IMMIB TAR-3 ^T (AM922283)	99,13	87,94	-36,58	98,99	47,29	88,08
<i>A. ramasamyi</i> M2T2B2 ^T (GQ246693)	99,94	89,18	-37,02	88,17	45,29	88,27
<i>A. rugosum</i> IMMIB AFH-6 ^T (AM419042)	99,47	94,21	-45,22	97,47	52,74	93,73
<i>A. soli</i> CC-LY788 ^T (KC297124)	99,94	92,37	-39,58	96,74		92,28
<i>A. thermophilum</i> CFH 70021 ^T (MH265951)	98,86	89,80	-38,26	95,40	49,63	89,06
<i>A. thiophilum</i> BV-S ^T (NR 116410)	99,94	87,95	-37,89	94,68	45,12	86,96
<i>A. zea</i> N7 ^T (DQ682470)	97,41					

ARTIGO V – Descrição e anotação genômica da estirpe *Pseudomonas ijaciense* sp. nov. (UFLA306^T), isolada da rizosfera de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.)

Resumo

O gênero *Pseudomonas* está distribuído nos solos e água. Representantes desse gênero são importantes na promoção de crescimento de plantas e outros como patógenos de animais e seres humanos. Uma estirpe bacteriana diazotrófica gram-negativa, aeróbica, espiral ou em forma de bastonete, não formadora de esporos, designada UFLA0306^T, foi isolada a partir um fragmento fino seccionado de raiz de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) em Ijaci, Minas Gerais. A análise filogenética das sequências dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *rpoD* e *gyrB* indicaram que a cepa é pertencente ao subgrupo *Pseudomonas*. O ANI (*Average nucleotide identity*) entre as estirpes e as espécies tipo mais próximas do gênero *Pseudomonas* demonstrou uma similaridade de 89,26% com *Pseudomonas putida* (NBRC 14164Y^T), 89,16% com *Pseudomonas monteilli* (NBRC 103158^T) e 85,25% com *P. entomophila* (L48^T). Além disso, a estirpe UFLA306^T pode ser distinguida de membros de espécies filogeneticamente relacionadas por diferenças nas propriedades fenotípicas das colônias formadas em meio sólido NFb como a cor creme, convexa, moderada, gomosa e brilhante após 2 dias de incubação. O conteúdo de DNA G+C da estirpe tipo é 61.93 ± 0,1 mol %. Com base em dados morfológicos, quimiotaxonômicos e dados filogenéticos, a cepa UFLA0306^T representa uma nova espécie dentro do gênero *Pseudomonas*, e propomos o nome de *Pseudomonas ijaciense*.

Palavras-chave: Metabolismo do N. Cactos. Associativas. Ijaci.

Introdução

O gênero *Pseudomonas*, pertencente à família Pseudomonadaceae, foi proposta pela primeira vez por Migula (1900). É um grupo de bactérias extremamente diversificado (LIU et al., 2021), não formadoras de esporos, móveis, em forma de bastonetes (PALLERONI, 1984) e podem ser encontrados em diferentes tipos de ambientes (LIU et al., 2021). Além disso, alguns são patógenos humanos e vegetais (BUSQUETS et al., 2017; PALLERONI, 1984). São atualmente descritos no gênero cerca de 300 espécies com nomes validamente publicados (<https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>). Muitos deles foram isolados do solo, rochas ou água nos últimos anos (NOVÁKOVÁ et al., 2020). Essas espécies têm sido organizadas com base em análises filogenéticas usando sequências dos genes 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* e *rpoB* para facilitar a classificação dentro do grupo.

Estudos têm sido desenvolvidos sobre rizobactérias do gênero *Pseudomonas* promotoras de crescimento de plantas (COSTA-GUTIERREZ et al. 2020; OROZCO-MOSQUEDA et al. 2019; SANDINI et al. 2019) comumente encontradas na rizosfera e

em solos agrícolas. Esses microrganismos possuem muitas características para atuar como agente de biocontrole (BALIAH, CHANDRASEHAR e SELVAN, 2018). São capazes de aumentar o crescimento das plantas e as protegem de estresses bióticos e abióticos (SOUZA et al., 2015), induzem tolerância a estresse salino (CHU et al. 2019) e contribuem para a redução de fertilizante nitrogenado mineral (SANDINI et al. 2019).

A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) uma planta da família cactaceae, categorizado como alimentícia não convencional, encontrada principalmente no estado de Minas Gerais (VEGA et al., 2020).

A bactéria diazotrófica UFLA0306^T foi obtida a partir um fragmento fino seccionado de raiz sem lavar (com remoção do solo aderido) da Ora-pro-nóbis e após o isolamento foi mantida em meio de cultura NFb semi-sólido (DÖBEREINER et al., 1995) reduzido o ácido málico para 0,5g L⁻¹ e acrescido a mesma quantidade de manitol e sacarose (MAGALHÃES, 1981). O local de coleta, o município de Ijaci (21° 10' 20.79'' S; 44° 55' 37.20'' O), apresenta 839 m de altitude e um solo de pH = 7.8; M.O. = 3.19; SB = 12.45; H+Al = 0.72, segundo Vega et al. (2020).

Baseado em análises fenotípicas, filogenéticas e na taxonomia genômica, o objetivo deste trabalho é descrever e comparar em nível de espécie a estirpe UFLA0306^T, associativa de ora-pro-nóbis, com outras estirpes tipo do gênero *Pseudomonas* coletadas em diferentes lugares, assim como o estudo genômico de genes funcionais e esclarecer a posição taxonômica da estirpe *Pseudomonas* UFLA0306^T.

Material e Métodos

Sequenciamento do genoma

Para obter as sequências genômicas de uma linhagem, a estirpe foi cultivada em cultura líquido Nfb (DÖBEREINER et al., 1995) reduzido o ácido málico para 0,5g L⁻¹ e acrescido a mesma quantidade de manitol e sacarose (MAGALHÃES, 1981) durante 2-3 dias. Depois disso, transferiu-se uma alíquota de 1 mL para microtubos para seguir com o protocolo de extração de DNA do kit de purificação de DNA genômico Wizard®. A preparação da biblioteca de DNA genômico foi realizada utilizando o kit de biblioteca NexteraXT (Illumina, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para medir a quantidade final da biblioteca utilizou-se KAPA SYBR® FAST qPCR com QuantStudio ® 5 System (Applied Biosystems, California, USA). A qualidade da biblioteca foi avaliada pela TapeStation HSD1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, EUA). Foi realizado um pooling equimolar de bibliotecas, e leituras

de pares (2X150 bases) foram sequenciadas no Illumina® HiSeq X (Illumina, Califórnia, EUA) com uma configuração de comprimento de leitura de 150 PE para leituras de 1,6 M PE (0,8M em cada direcção) por amostra. Para a montagem da UFLA0306^T utilizou-se SPADes 3.13.0 (BANKEVICH et al. 2012). A qualidade e integralidade dos genomas foram verificadas com CheckM 1.0.18 (PARKS et al. 2015). A anotação dos genes foi feita com RAST (AZIZ et al. 2008). Todas estas análises foram realizadas utilizando a plataforma Kbase (<https://www.kbase.us/>).

Genes 16S rRNA

As estirpes consideradas para a comparação foram identificadas na página de referências do bacterio (<https://www.bacterio.net>), considerando apenas as estirpes publicadas validamente e corretas segundo Winslow et al. (1917) e até o momento (5 de fev. 2023) na CIPE (Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos). A sequência de 16s rRNA da estirpe UFLA0306^T foi extraída pelo MIGA (<http://microbial-genomes.org/>) e as sequências das 40 espécies tipo, dentre os 310 descritas (de um total de 524 estirpes no banco de dados) mais próximas da UFLA0306^T, foram extraídas do banco de dados de nucleotídeos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), desconsiderando as estirpes não-cultiváveis, o *Query Cover* acima de 98% e percentual de identificação maior que 96,60%, para gerarmos as árvores filogenéticas. As sequências foram alinhadas com MUSCLE em Mega X (KUMAR et al. 2018).

O algoritmo de alinhamento múltiplo MUSCLE (EDGAR, 2004) foi usado para alinhar as sequências. A árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) baseada em sequências do gene 16S rRNA foi reconstruída no software MEGA Versão 11.0.10 (2021) pelo método Neighbor-join (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) com *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 replicações, utilizando o algoritmo *maximum-likelihood* (KUMAR, STECHER e TAMURA, 2016). A distância evolutiva foi calculada usando o modelo Kimura 2-parameter que apresentou o melhor ajuste.

ANI

Foi realizada uma análise de similaridade (ANI) do genoma sequenciado com 40 genomas intimamente relacionados com espécies de *Pseudomonas* descritas utilizando o FastANI v.0.1.3 (FastANI module and source code:

<https://github.com/ParBLiSS/FastANI>), pela plataforma Kbase, para verificar se é a mesma espécie que os isolados de referência e já descritos ($\geq 95\%$ ANI).

Multilocus sequence analysis

As análises filogenéticas das sequências de genoma e a montagem dos contigs (*gyrB*, *rpoB*, *rpoD*) foram realizadas no software MEGA versão X, pelo método de união de vizinhos (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) usando o parâmetro TR: General Time Reversible com bootstrap de 1000 replicações, utilizando o algoritmo *maximum-likelihood* (KUMAR, STECHER, e TAMURA, 2016). O algoritmo de alinhamento múltiplo MUSCLE (EDGAR, 2004) foi usado para alinhar as sequências. A concatenação de genes foi realizada com o software Seaview com os fragmentos de sequencia de três genes *gyrB*, *rpoB*, e *rpoD* e seguindo a mesma ordem. As sequencias de genoma das estirpes tipo foram baixadas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os números de acesso encontrados na tabela S2.

Caracterização fenotípica

Para a caracterização morfológica da estirpe UFLA0306^T, os isolados foram incubados por 72 horas em câmara de crescimento a 28 °C em meio de cultura NFb. A coloração de gram foi realizada como descrito anteriormente por Murray, Doestsch e Robinow (1994). Os testes fisiológicos foram realizados em meio líquido NFb em 3 repetições e meio sólido LB (MULET et al. 2012). Experimentos independentes sob uma variedade de condições, segundo Tikhonova, Grouzdev e Kravchenko (2019).

A atividade da catalase foi examinada pela adição de 5% (v / v) solução de H₂O₂ para as colônias. A faixa de temperatura para crescimento testada foram entre 15 – 40°C. A faixa de pH de crescimento foi determinado no mesmo meio NFb líquido e sólido LB (10 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de cloreto de sódio) com pH final de 3 a 9 com um incremento de 0,5. HCl a 1% foi usado para ajustar o pH de 3 a 5, KOH 10% foi usado para pH 6 a 9. A tolerância ao sal foi testada no mesmo meio contendo 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4% (p / v) de NaCl. A resistência à antibióticos foi testada em meio DIGs sólido quanto a presença de ácido nalidixico (30 mcg), amicacina (30 mcg), amoxicilina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), azitromicina (15 mcg), aztreoanam (30 mcg), cefuroxima (30 mcg), claritromicina (15 mcg), cloranfenicol (30 mcg), doxiciclina (30 mcg), eritromicina (15 mcg), estreptomicina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), lincomicina (2 mcg), neomicina (30

mcg), oxalina (1 mcg), penicilina (10 UI), polimixina (300 UI), rifamicina (5 mcg), sulfonamida (300 mcg), tetraciclina (30 mcg) e vancomicina (30 mcg).

A capacidade de fixação de nitrogênio foi determinada anteriormente e em meio de cultura NFb semi-sólido modificado por Magalhães (1981), incubados a 28 °C por 10 dias, e confirmada pela formação de película na superfície. A utilização de fontes de carbono e nitrogênio individuais e demais análises fisiológicas foram investigadas utilizando o kit de testes API 20NE seguindo as instruções do fabricante (bio- M erieux) com incubação a 37° C e conforme metodologia previamente descrita (MICHEL et al. 2017).

As características das colônias ainda foram avaliadas quanto ao tempo de crescimento, diâmetro médio (mm), forma (puntiforme, circular ou irregular), borda (inteira, ondulada, lobada, denteada ou filamentosa), superfície (lisa, rugosa ou papilada), produção de goma (escassa, pouca, moderada ou abundante), elevação (plana, lenticular, convexa ou umbilicada), consistência da massa de crescimento (seca, aquosa, gomosa, viscosa ou butírica), e detalhes ópticos (transparente, translucido, opaco ou brilhante). Para conservação e armazenamento, os isolados foram colocados em água destilada esterilizada à temperatura ambiente e também liofilizados.

Resultados e discussões

Sequências e ANI

O genoma possui 5.989.801 pb e uma contaminação de 0,29. O valor observado de ANI foi 89,26%, considerado baixo e em relação a estirpe *P. Monteilii* (NBRC 103158^T), seguida da estirpe *P. Putida* (NBRC 14164Y^T) (89,16%) conforme a matrix ANI/AAI de similaridade elaborada na plataforma Kostas (<http://enve-omics.ce.gatech.edu>) (RODRIGUEZ-R e KONSTANTINIDIS, 2016).

Tabela 1. Matriz mostrando a porcentagem de semelhança de nucleotídeos aos pares das sequências completas entre a cepa UFLA0306^T e as cepas do tipo de referência das espécies mais próximas; os números de acesso são dados entre parênteses.

ANI with strain						
Estirpes	2	3	4	5	6	
1 <i>Pseudomonas</i> UFLA0306 ^T	89,26	89,16	83,98	85,25	85,19	
2 <i>P. putida</i> NBRC14164Y ^T (NC 021505)	-	90,15	84,16	85,56	85,71	
3 <i>P. monteilii</i> NBRC103158 ^T (NZ BBIS01000132)	-	-	84,08	85,55	86,42	
4 <i>P. fulva</i> NBRC16637 ^T (NZ BBIQ01000046)	-	-	-	85,25	85,19	
5 <i>P. entomophila</i> L48 ^T (NC 008027)	-	-	-	-	88,83	
6 <i>P. mosselii</i> DSM17497 ^T (NZ KK211238)	-	-	-	-	-	

Análise filogenética

Nossa comparação da sequência de rDNA 16S extraído do genoma confirmou que a cepa U0306^T pertence ao gênero *Pseudomonas*. A filogenia do gene 16S rRNA indicou uma similaridade maior entre a estirpe UFLA0306^T e as cepas *P. putida* (NBRC 14164Y^T) (89,26%), *P. monteilii* (NBRC 103158^T) (89,16%), *P. fulva* (NBRC 16637^T) (83,98%), *P. entomophila* (L48^T) (85,25%) e *P. mosselii* (DSM 17497^T) (85,19%) e (Fig. S1).

A análise filogenética baseada em quatro genes parciais concatenados (16S rDNA, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD*) (Fig. S2) indicou que U0306^T pertence a linhagem *Pseudomonas* sp., mas é distinta de qualquer espécie conhecida de *Pseudomonas*. As árvores individuais da subunidade beta girase (*gyrB*), subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) e RNA polimerase, genes parciais do fator 70 sigma (*rpoD*), são apresentados na Fig. S3, S4 e S5. As árvores destes três genes foram construídas como descrito em MULET et al. (2010).

Os números indicam a porcentagem de ocorrência do ramo em árvores bootstrapped. Com 1400C pares de base a sequência de acesso mais similar encontrada no GenBank considerando o gene 16S é KF317736. As sequências dos genes housekeeping extraídos do genoma e utilizadas na análise filogenética têm um número de pares de base de 2379 para o gene *gyrB*, 4197 pb de *rpoB* e 1845 pb para *rpoD* utilizando o modelo TR: General Time Reversible. A estirpe UFLA306^T demonstrou uma similaridade de 92,46% com a estirpe *P. monteilli* NBRC103158^T e 92,18% com a *P. putida* NBRC1464T, em relação aos genes *housekeeping* concatenados (Tabela S3).

A partir da homologia de sequências de aminoácidos, não observamos a presença de genes de resistência a antibióticos que induzem padrões de resistência à cefotaxinma, amoxicilina e tetraciclina (*blaCT X-M*, *blaTEM* e *tetA*) como encontrado em *P. aeruginosa* (ALGAMMAL et al., 2020). Foi identificado também que a estirpe U0306T possui dois sistemas de detecção de quorum de N-acil-homoserina lactona que regulam grandes conjuntos de genes sobrepostos (SCHUSTER e GREENBER, 2006; LIN et al. 2003).

Segundo a tabela S1 foram identificados diferentes genes responsáveis pela resistência a diferentes condições ambientais, tais como os genes *rpoS*, conhecido por responder à densidade celular, apresentando maior expressão na fase estacionária

(KOJIC e VENTUTI, 2001), *AlkB* (alkane hydroxylase), repressor transcricional *PutA* e *PutP* (Proline/sodium symporter)/ Proline dehydrogenase (EC 1.5.5.2) / Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (EC 1.2.1.88), *HutX*, *ProV* (Glycine betaine/L-proline transport ATP-binding protein), *OprD* (Outer membrane low permeability porin family => OccD7/OpdB proline), *AlgB* (Alginate biosynthesis two-component system response regulator), *Prop* (L-Proline/Glycine betaine transporter), proteínas reguladoras de alginato *AlgP*, regulador transcricional positivo de *AlgD*, um codificados da GDP manose desidrogenase, uma enzima que converte a GDP manose em GDP-ácido manurônico, um precursor do exopolissacarídeo alginato. Identificamos a presença no genoma de proteínas reguladoras de nitrogênio (*NtrB*, *GlnG* = *NtrC*, *GlnK*) e two-component sensor *CbrA* e *CbrB*: intracellular carbon: nitrogen balance na utilização da histidina (ZHANG e RAINEY, 2008), *PtsN* (Proteína reguladora de nitrogênio tipo PTS IIA), regulação de nitrogênio associada a proteína fosfocarreadora (Tab. S2).

Análises fenotípicas

Os limites de temperatura para o crescimento foram 15-40 °C com uma temperatura ótima a 30° C, estando essa estirpe dentre as próximas que suportaram temperaturas mais elevadas junto a *P. entomophila* (L48^T). A estirpe foi capaz de crescer nas faixas de pH de 4,5 a 9,0 com um ótimo em 5,0, não ocorrendo crescimento a pH 4; e na faixa de salinidade de 0,5 a 3,5% (p/v) NaCl com o ótimo em 1% e não tolerando valores maiores que esses. As colônias tinham cerca de 2 mm após dois dias de incubação em meio de cultura NFb a 28°C, cor creme, convexa, moderada, gomosa e brilhante. O crescimento não foi detectado a temperatura de 40°C quando em meio liquido NFb, apenas em LB sólido. Ao compararmos a nossa estirpe com *P. putida*, estirpe mais próxima filogeneticamente, essa última não apresentou hidrolase de gelatina e assimilação positiva de D-arabinose e D-mannose. A estirpe UFLA0306^T ainda foi testada quanto a D-arginine e D-glucose e foram positivas em relação a estirpe mais próxima como visto na tabela a seguir:

Tabela 2. Características que diferenciam *Pseudomonas ijaciensis* (U0306^T) de suas espécies tipo mais próximas.

Characteristics	1	2 ^a	3 ^{ab}	4 ^a	5 ^c	6 ^a
Fluorescence	ND	+	-	+	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+
Growth temperature	15 - 40	5 - XX	10 - 36	5 -42	4-35	5-XX°C

(°C)						
pH	4,5 - 9,0	>4	>4	>4		>4
Tolerance NaCl	0,5 - 3,5%	<6%	3%	6%	+	8%
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	-
Hydrolysis of gelatin	+	-	-	+	-	-
Esculin ferric citrate	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	+	-	-	-
Nitrato de potássio	-	ND	ND	ND	ND	ND
L-tryptophane	-	ND	+	ND	ND	ND
L-arginine	+	ND	-	ND	ND	ND
Assimilation of 4-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside	-	ND	-	ND	ND	ND
D-glucose	+	-	+	+	-	+
L-arabinose	-	+	+	+	-	+
D-mannose	-	+	-	+	+	+
D-manitol	-	-	-	+	+	-
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	+	+	-
D-maltose	-	-	-	-	-	-
Potássio gluconate	+	+	ND	+	ND	+
Acido caprico	+	+	+	+	ND	+
Acido adipic/adipate	-	-	-	-	ND	-
Acido málico	+	+	+	+	ND	+
Citrato trisodium	+	+	ND	+	ND	+
Phenylacetic acid	+	+	+	+	-	-
d-Mannose	ND	-	w	+	+	+
Dextrin	ND	w	w	-	+	-
Tween-40	ND	+	+	+	+	+
d-Cellobiose	ND	-	-	-	+	w
d-Trehalose	ND	-	-	-	+	-
GC content (%)	61.93	62,5	60	60	60.3	60

Legenda: Cepas: 1. UFLA306 2. *P. putida* (NBRC_14164YT) 3. *P. monteilli* (NBRC_103158T) 4. *P. entomophila*(L48T) 5. *P. moraviensis* (1B4T); 6. *P. fulva* (NBRC_16637T). Abbreviations: -, negative; +, positive; ND, not determined. Mulet et al. 2012^a; Dabboussi et al. 2002^b; Tvrzová et al. 2006^c, Jia et al. 2020^c. ND = unidentified.

Com base nos testes realizados e dados apresentados esta cepa representa uma nova espécie do gênero *Pseudomonas*, e as espécies mais próximas são: *Pseudomonas putida* (NBRC 14164Y^T), *Pseudomonas monteilli* (NBRC 103158^T) e a cepa *Pseudomonas entomophila* (L48^T). Em conclusão, os resultados do presente estudo, incluindo evidências morfológicas e filogenéticas e diferenças fisiológicas e

bioquímicas, indicam que a estirpe UFLA0306^T representa uma nova espécie de o gênero *Pseudomonas*, para o qual o nome *Pseudomonas ijacinense* é proposto.

Descrição da espécie

As células são diazotróficas Gram-negativas, aeróbicas e em forma de bastonete (são 0,6–0,8 × 2,0–4,0 μm.) quando isoladamente. Catalase e oxidase positivas. As colônias são circulares de cor creme, convexa, moderada, gomosa e brilhante após 2 dias de incubação e cerca de 2 mm. O crescimento ocorre com 0,5 - 3,5% (p/v) NaCl (ótimo 1%), em pH 4,5 - 9,0 (ótimo 5,0) e 15 - 40 °C (ótimo 30 °C). As células são capazes de crescer em nitrogênio meio livre, caldo nutriente e DIGS. Os resultados da API 20NE são positivos para arginine dihydrolase, hidrólise da B-glucosidade (esculin) e protease (gelatina), glucose e negativo para redução de nitratos, produção de indol, fermentação (glucose), uréase, B-galactosidade. Utiliza vários compostos como única fonte de carbono, incluindo D-glucose, Gluconato de potássio, ácido cáprico, ácido málico, citrato trissódico e ácido fenilacético. Negativo para as fontes de carbono: arabinose, manose, manitol, n-acetyl-glucosamine e ácido adípico. A UFLA0306^T apresentou resistência aos antibióticos: ácido nalidixico, amicacina, azitromicina, cloranfenicol, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, polimixina, rifamicina, sulfonamidas e tetraciclina. As cepas podem diferir na utilização de L-arginine, D-glucose e Hydrolysis of gelatin. O conteúdo de DNA G+C da cepa tipo é 61.93 ±0,1 mol %. O genoma e sequência de rRNA 16S da estirpe *Pseudomonas ijaciense* foi depositada no GenBank sob número _____ .

REFERÊNCIAS

- ALGAMMAL, A.M., MABROK, M., SIVARAMASAMY, E. *et al.* (2020) Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *toxA* virulence genes and *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, and *tetA* antibiotic-resistance genes. **Sci Rep** 10, 15961. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4>
- AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A. *et al.* (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics** 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- BALIAH, V. D.; CHANDRASEHAR, G.; SELVAM, P. N. (2018) Chapter 10 - *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops, Editor(s): Ram Prasad, Sarvajeet S. Gill, Narendra Tuteja, **Crop Improvement Through Microbial Biotechnology**, Pages 221-243, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00010-4>.
- BANKEVICH, A.; NURK, N.; ANTIPOV, D.; ALEXEY A. G.; MIKHAIL D.; ALEXANDER S. K.; VALERY M. L.; SERGEY I. N.; SON P.; ANDREY D. P.; ALEXEY V. P.; ALEXANDER V. S.; NIKOLAY V.; GLENN T.; MAX A. A.; PAVEL A. P. (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, 455-77. <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- BELHAJ, A.; DESNOUES N.; ELMERICH C. (2002) Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a polluted zone: identification of *alkB* and *alkB*-related genes. **Res. Microbiol.**153(6):339-44. <https://doi.org/10.1016/s0923-2508>.
- BUSQUETS, A.; GOMILA M.; BEIKI F.; MULET M.; RAHIMIAN H.; GARCIA-VALDES E., LALUCAT J. (2017) *Pseudomonas caspiana* sp. nov., a citrus pathogen in the *Pseudomonas syringae* phylogenetic group. **Syst Appl Microbiol**; 40:266-273. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.04.002>.
- CHEN, Xin-Yue *et al.* (2022) Improved the lipopeptide production of *Bacillus amyloliquefaciens* HM618 under co-culture with the recombinant *Corynebacterium glutamicum* producing high-level proline. **Bioresource Technology**, v. 349, p. 126863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126863>
- CHU, T.N.; TRAN, B.T.H.; VAN B. L. *et al.* (2019) Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Res Notes** 12, 11. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4046-1>.
- COSTA-GUTIERREZ, S.B.; LAMI, M.J.; SANTO, M.C.D. *et al.* (2020) Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of *eptA*. **Appl Microbiol Biotechnol** 104, 4577–4592. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>.
- DABBOUSSI F.; HAMZE M.; SINGER E.; GEOFFROY V.; MEYER J.M.; IZARD D. (2002) *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. **Int J Syst Evol Microbiol.** 52(Pt 2):363-376. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-36>.

EDGAR, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.** 32(5):1792-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

FELSENSTEIN, J. (1985) "Phylogenies and the Comparative Method." *The American Naturalist* 125, no. 1: 1–15. <http://www.jstor.org/stable/2461605>.

JIA, J.; WANG X.; DENG, P.; MA, L.; BAIRD, S.M.; LI, X.; LU, S.E. (2020) *Pseudomonas glycinae* sp. nov. isolated from the soybean rhizosphere. **Microbiologyopen.** 9(9):e1101. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1101>.

JORGENSEN, Frieda et al. (1999) RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology.** v. 145, n. 4, p. 835-844, 1999.

KOJIC M.; VENTURI V. (2001) Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a *TetR* family regulator. **J Bacteriol.** 183(12):3712-20. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3712-3720.2001>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol.** 1;35(6):1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol.**33(7):1870-4.: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LIN Y.H.; XU J.L.; HU J.; WANG L.H.; ONG S.L.; LEADBETTER J.R.; ZHANG L.H. (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. **Mol Microbiol.** Feb;47(3):849-60. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03351>.

LIU Y.; SONG Z.; ZENG H.; LU M.; ZHU W.; WANG X.; LIAN X.; ZHANG, Q. (2021) *Pseudomonas eucalypticola* sp. nov., a producer of antifungal agents isolated from *Eucalyptus dunnii* leaves, **Scientific reports**, Nature. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82682-7>

MAGALHÃES F.M.M. (1981) Nitrogen fixing bacteria isolated from diversesoils and grass roots in Amazônia. In: Vose P, Ruschel AP (eds)Associative N2–Fixation, New York, CRC, pp 39-48.

MIGULA W. (1900) **System der Bakterien.** G. Fischer, Jena. 2. Band1–1068

MICHEL D.C.; PASSOS S.R.; SIMÕES-ARAUJO J.L.; BARAÚNA A.C.; DA SILVA K. et al. (2017) *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. **Arch Microbiol**, 199:657–664.

MULET M.; GOMILA M.; LEMAITRE B.; LALUCAT J.; GARCÍA-VALDÉS E. (2012) Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, 35, pp. 145-149. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.12.003>.

MULET, M., LALUCAT, J., GARCÍA-VALDÉS, E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. **Environ. Microbiol.** 12, 1513–1530.

MURRAY, R.G.E., DOETSCH, R.N., ROBINOW, C.F. (1994) **Determinative and cytological light microscopy**. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., and Krieg, N.R. (eds). Washington, DC, USA: **American Society for Microbiology**, pp. 21–41.

NISHIJYO, T.; HAAS, D.; ITOH, Y. (2001) The CbrA–CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular microbiology**, v. 40, n. 4, p. 917–931. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02435.x>

NOVÁKOVÁ, D.; SVEC, P.; ZEMAN, M.; BUSSE, H.; MAŠLAŇOVÁ, I.; PANTUČEK, R.; KRÁLOVÁ, S.; KRIŠTOFOVÁ, L.; SEDLÁČEK, I (2020) *Pseudomonas leptonychotis* sp. nov., isolated from Weddell seals in Antarctica. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**;70:302–308. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003753>.

OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; DUAN, J.; DIBERNARDO, M.; ZETTER, E.; CAMPOS-GARCIA, J.; GLICK, B.R.; SANTOYO, G. (2019) The Production of ACC Deaminase and Trehalose by the Plant Growth Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 Synergistically Protect Tomato Plants Against Salt Stress. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01392>.

PALLERONI, N. J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 1, pp. 141–199. Edited by N.R. Krieg e J. G. Holt. Baltimore: Williams e Wilkins.

PARKS D.H.; IMELFORT M.; SKENNERTON C.T.; HUGENHOLTZ P.; TYSON G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Res.** 25(7):1043-55. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.

RODRIGUEZ-R L.M.; KONSTANTINIDIS K.T. (2016). The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. [PeerJ Preprints 4:e1900v1](https://doi.org/10.1101/061224).

SAITOU N e NEI M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.

SANDINI, I.E.F.; PACENTCHUK, M.; HUNGRIA, M.A.; NOGUEIRA, S.P.D.; CRUZ, A.S.; NAKATANI, R.S. A. (2019) Seed inoculation with *Pseudomonas fluorescens* promotes growth, yield and reduces nitrogen application in maize. *Intl. J. Agric. Biol.*, 22: 1369–1375. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1210>.

SCHUSTER, M. E.; PETER G. (2006) A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*, **International Journal of Medical Microbiology**, Volume 296, Issues 2–3, Pages 73-81, ISSN 1438-4221, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036>.

SOUZA R.; SANT'ANNA F.H.; AMBROSINI A.; TADRA-SFEIR M.; FAORO H.; PEDROSA F.O.; SOUZA E.M.; PASSAGLIA L. M. (2015) Genome of *Pseudomonas* sp. FeS53a, a Putative Plant Growth-Promoting Bacterium Associated with Rice Grown in Iron-Stressed Soils. **Genome Announc.** <https://doi.org/10.1128/genomeA.00248-15>.

TIKHONOVA E.N.; GROUZDEV D.S.; KRAVCHENKO I.K. (2019) *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog. **Int J Syst Evol Microbiol.** 69(9):2787-2793. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003560>

TVRZOVÁ, L.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C.; SEDLÁČEK, I.; PÁČOVÁ, Z.; ŠEDO, O., ... LANG, E. (2006). *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56(11), 2657–2663. [https://doi.org/10.1099/ijms.0.63988 - 0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.63988-0).

VEGA, C.; KEMMELMEIER, K.; RUFINI, M.; DE CARVALHO, T.; MOREIRA, F. (2020). Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Nutrition as Related to Soil Chemical and Physical Attributes and Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. 20. 1637-1654. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00235-9>.

WINSLOW C.E.; BROADHURST J.; BUCHANAN R.E.; KRUMWIEDE C.; ROGERS L.A.; SMITH G.H.; (1917) The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. **J. Bacteriol**; 2:505-566

ZHANG X.X.; RAINEY P.B. (2008) Dual involvement of *CbrAB* and *NtrBC* in the regulation of histidine utilization in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Genetics**.178(1):185-95. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.081984>.

Apêndice E

Tabela S1 – Genes de resistência encontrados na estirpe U0306T em relação as demais estirpes mais próximas.

Strain	Size	Number of features	Resistance Gene								
			<i>rpoS</i> ¹	<i>ALkB</i> ²	<i>PutA</i> ³	<i>PutP</i>	<i>HutX</i>	<i>ProV</i>	<i>OprD</i>	<i>AlgB</i>	<i>ProP</i>
			Production of several virulence/quorum sensing	Encoding alkane-1-monooxygenase (alkane hydroxylase)	Proline dehydrogenase	Proline/sodium symporter	Histidine, proline, and proline betaine ABC transporter	Glycine betaine/L-proline transport	Outer membrane low permeability porin	Regulation of alginate biosynthesis	L-Proline/Glycine betaine transporter
U0306T	5,989,801	5,752	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	6,316,979	5,977	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>P. fluorescens</i>	6,511,547	6,176	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>P._putida</i>	6,156,701	16,827	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P._monteiii</i>	6,308,713	6,494	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Genes relacionados

com estresse no solo e a fixação biológica de nitrogênio encontrada no genoma e algumas estirpes de referência. Jorgensen et al. (1999)¹; Belhaj, Desnoues, Elmerich (2002)²; Chen et al. (2022)³. NCTC10332^{T(A)}, SBW25^{T(B)}, NBRC 14164Y^{T(C)}, NBRC 103158^{T(D)}.

Tabela S2 – Genes relacionados a regulação do nitrogênio pela estirpe U0306T e demais estirpes tipo mais próximas.

Strain	Size	Number of features	Nitrogene gene				
			NtrB	GlnG	GlnK	cbrA ¹	cbrB ³
			Nitrogen regulation protein	Nitrogen regulation protein NR(I)	Nitrogen regulatory protein P-II	Two-component sensor: intracellular carbon:nitrogen balance	PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein
<i>Pseudomonas_U0306</i> ^T	5,989,801	5,752	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ^A	6,316,979	5,977	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> ^B	6,511,547	6,176	+	+	+	+	+
<i>P._putida</i> ^C	6,156,701	16,827	+	+	+	-	+
<i>P._monteilii</i> ^D	6,308,713	6,494	+	+	+	-	+

Legenda: Genes relacionados com estresse no solo e a fixação biológica de nitrogênio encontrada no genoma e algumas estirpes de referência. Nishijyo et al (2001)¹. NCTC10332^{T(A)}, SBW25^{T(B)}, NBRC 14164Y^{T(C)}, NBRC 103158^{T(D)}

Tabela S3. Similaridade entre as estirpes tipo para cada um dos genes housekeep e a UFLA0306^T.

Estipes	16S rRNA	gyrB	rpoB	rpoD	concatenada
<i>Pseudomonas</i> U0306 ^T	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>P. alcaligenes</i> ATCC14909 ^T (AF094721)	99,21	78,36	86,71	78,23	70,31
<i>P. argentinensis</i> CH01 ^T (NR 043115)	99,77	79,08	87,20	78,96	73,15
<i>P. cedrina</i> DSM17516 ^T (KX186938)	97,49	80,47	86,41	80,36	69,99
<i>P. chengduensis</i> MBR ^T (EU307111)	99,06	78,15	86,86	78,01	72,71
<i>P. chlororaphis</i> DSM50083 ^T (NR 116723)	99,45	81,78	87,01	81,62	73,09
<i>P. donghuensis</i> HYS ^T (NR 136501)	99,94	85,48	91,25	85,03	82,96
<i>P. entomophila</i> L48 ^T (NR 102854)	99,34	86,47	93,02	87,80	86,83
<i>P. extremorientalis</i> KMM3447 ^T (NR 025174)	98,28	81,75	86,81	81,65	71,90
<i>P. flavescens</i> B62 ^T (NR 025947)	99,22	78,52	86,30	78,37	68,27
<i>P. fulva</i> NBRC16637 ^T (NR 113857)	99,94	85,68	93,24	84,15	86,21
<i>P. gessardii</i> CIP105469 ^T (NR 024928)	97,11	82,06	88,31	81,85	71,10
<i>P. graminis</i> DSM11363 ^T (NR 026395)	99,49	79,28	85,49	79,26	72,25
<i>P. helleri</i> DSM29165 ^T (NR 148763)	99,64	80,09	85,78	80,04	70,78
<i>P. jessenii</i> CIP105274 ^T (NR 024918)	99,70	82,09	85,09	81,85	73,89
<i>P. lini</i> DLE411J ^T (NR 029042)	99,62	82,00	88,46	81,79	72,91
<i>P. lutea</i> OK2 ^T (NR 029103)	99,94	70,22	78,68	70,17	62,77
<i>P. mendocina</i> ATCC25411 ^T (MK265746)	99,94	79,08	86,79	78,96	73,84
<i>P. migulae</i> NBRC103157 ^T (NR 114223)	99,94	81,99	87,97	81,77	72,49
<i>P. monteilii</i> NBRC103158 ^T (NR 114224)	99,75	92,28	97,05	92,04	92,46
<i>P. mosselii</i> CIP105259 ^T (AF072688)	99,38	86,16	90,13	87,48	84,41
<i>P. punonensis</i> LMT03 ^T (NR 109583)	99,63	78,21	86,66	78,09	68,20
<i>P. putida</i> NBRC14164 ^T (NR 113651)	99,79	92,26	96,43	92,26	92,18
<i>P. reidholzensis</i> CCOS865 ^T (LT009707)	99,29	86,85	91,94	87,22	86,34
<i>P. rhizosphaerae</i> DSM16299 ^T (AY152673)	99,16	81,12	87,86	81,13	76,22
<i>P. rhodesiae</i> CIP104664 ^T (NR 024911)	97,87	79,76	85,43	79,67	68,46
<i>P. silesiensis</i> A3 ^T (NR 156815)	99,94	81,98	87,65	81,74	73,20
<i>P. straminea</i> JCM2783 ^T (LC420056)	99,94	79,20	86,77	79,08	72,74
<i>P. synxantha</i> DSM18928 ^T (KX186990)	97,03	81,17	86,25	81,06	70,27
<i>P. veronii</i> CIP104663 ^T (NR 028706)	98,18	81,86	87,02	81,80	71,63
<i>P. wadenswilerensis</i> CCOS864 ^T (LT009706)	99,94	85,35	91,30	84,92	83,15
<i>P. weihenstephanensis</i> DSM29166 ^T (KP738720)	99,94	80,17	85,83	80,11	70,85

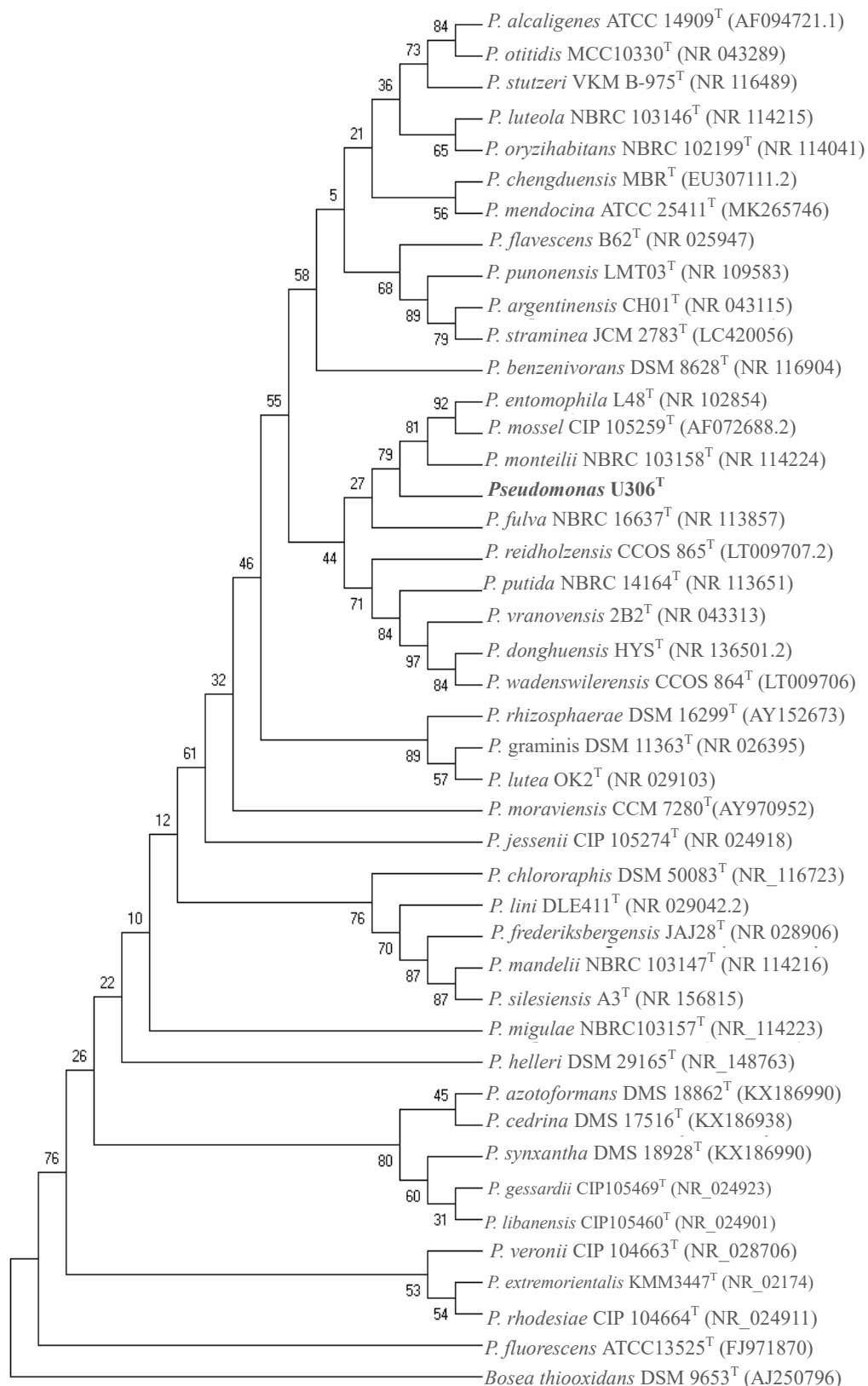


Figura S1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada em seqüências do gene 16S rRNA (1381 posições de nucleotídeos no conjunto de dados final). A árvore mostra a posição filogenética da cepa U306^T e as espécies mais estreitamente relacionadas. Os valores de bootstrap (> 50%) com base em 1000 replicações são representados nos nós de ramificação. *Bosea thiooxidans* DSM 9653^T foi usado como um grupo externo. Identificadores do genoma das seqüências do gene 16S rRNA usadas são fornecidas entre parênteses.

Figura S2. Árvore filogenética de junção de vizinhos baseada no gene *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD* concatenado parcial de *Pseudomonas* U0306^T e as cepas tipo de outras espécies de *Pseudomonas*. A evolução as distâncias foram calculadas pelo método TR: General Time Reversible. A porcentagem de replicar árvores nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados junto aos ramos.

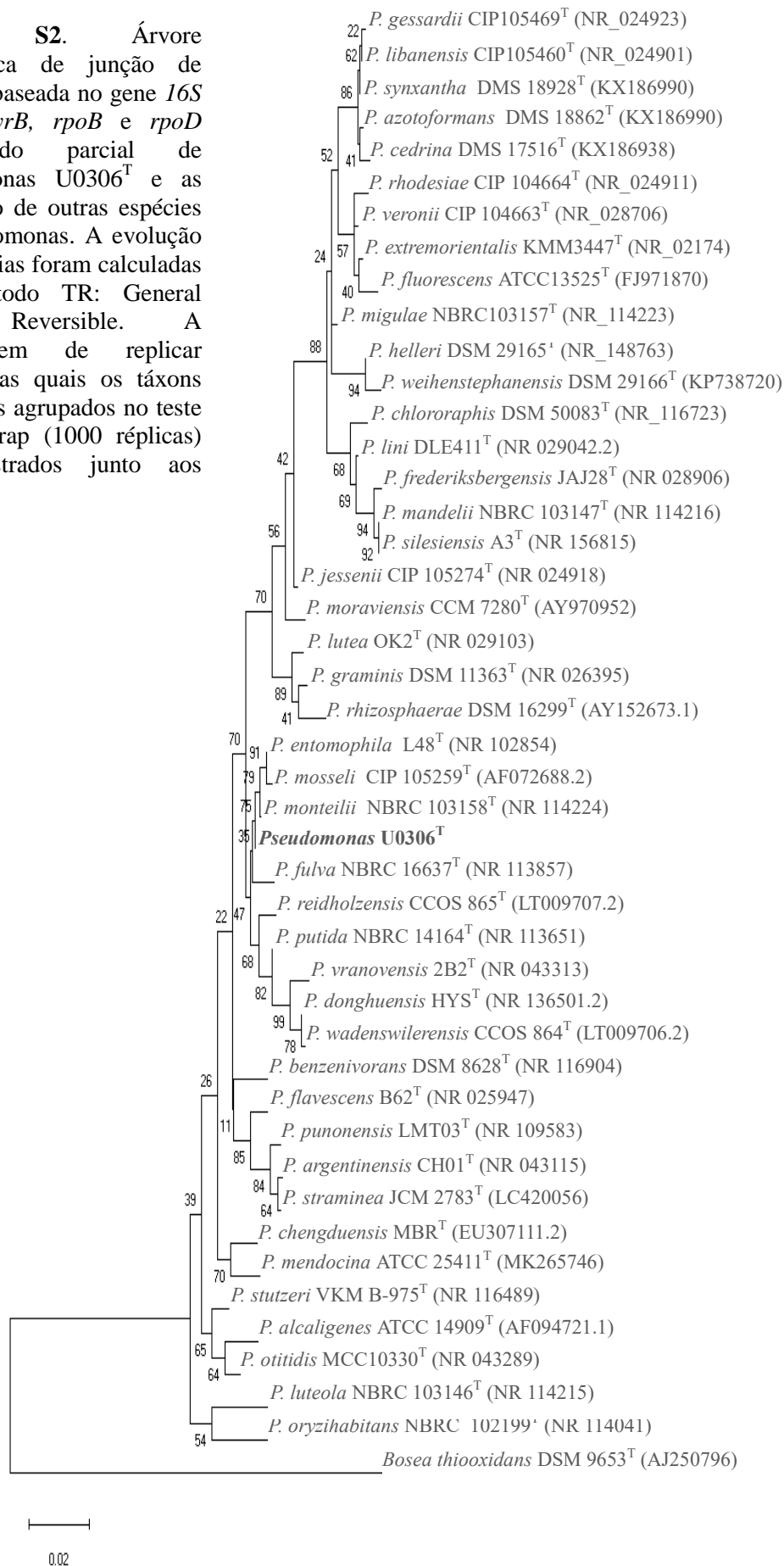


Figura S3. Árvore filogenética baseada no gene *gyrB* de *Pseudomonas* U0306^T e as estirpes tipo de outras espécies de *Pseudomonas*. A evolução as distâncias foram calculadas pelo método TR: General Time Reversible. A porcentagem de replicar árvores nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados junto aos ramos.

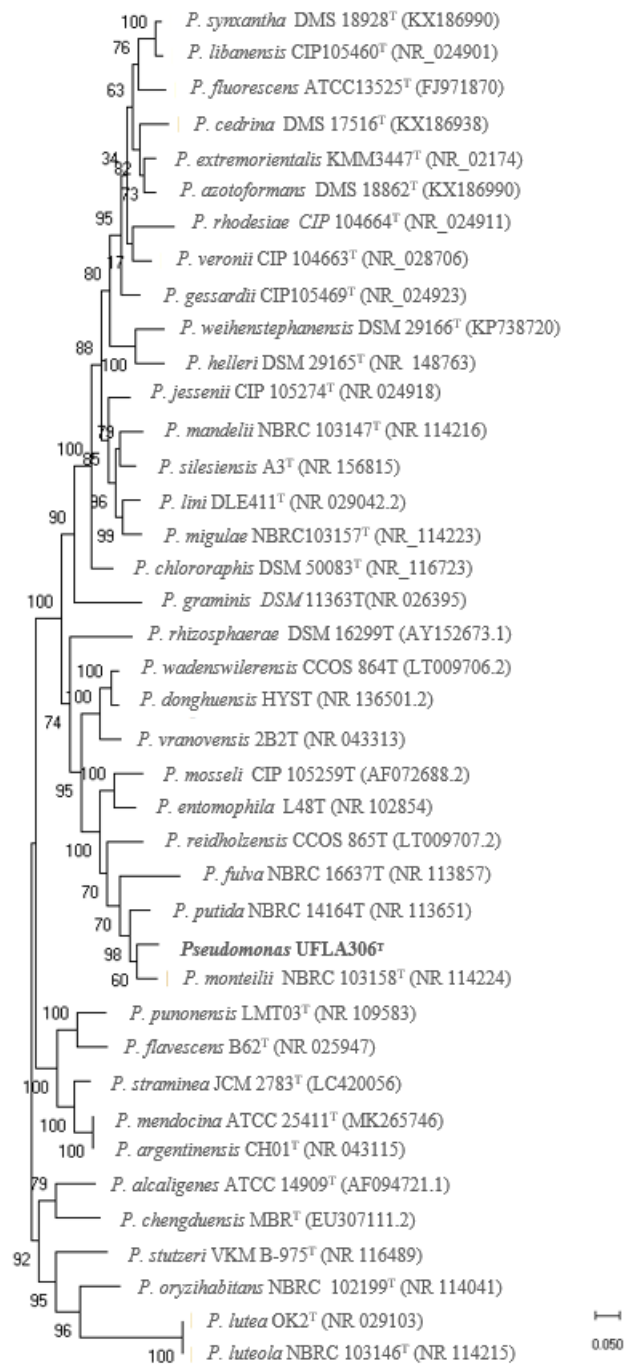
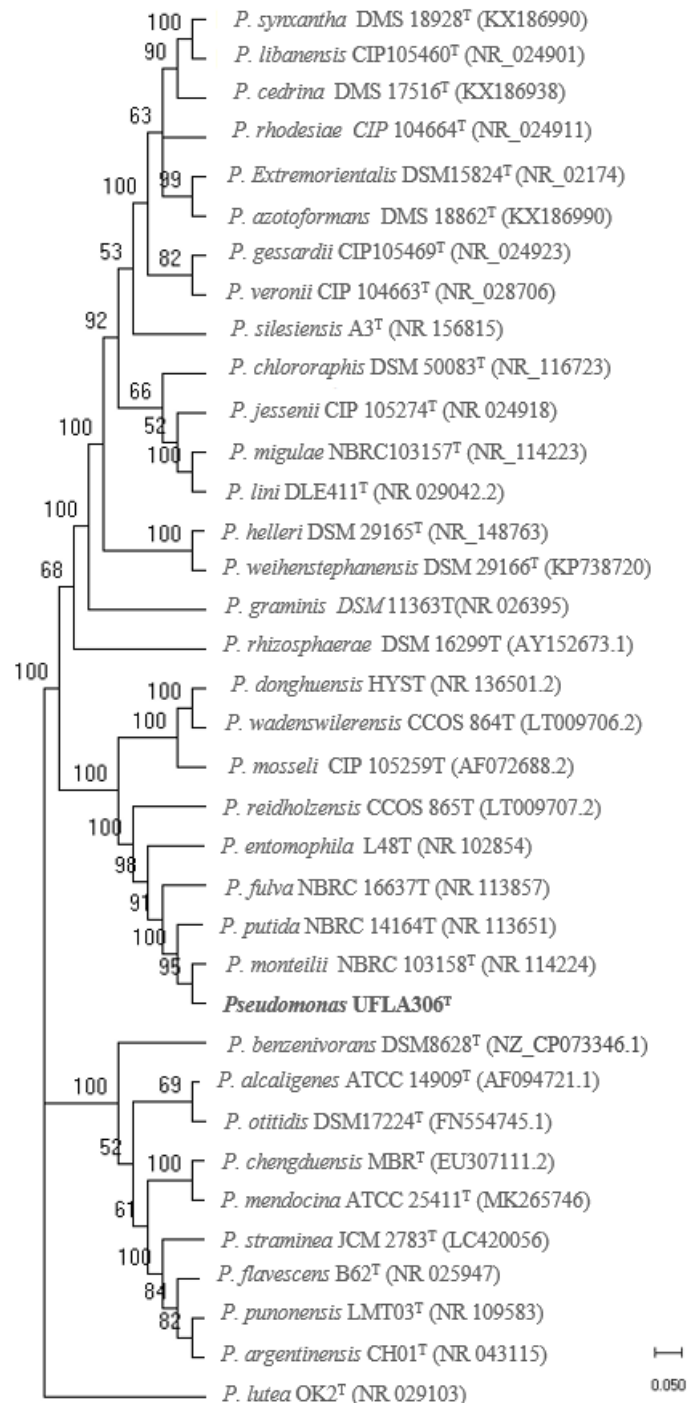


Figura S4. Árvore filogenética baseada no gene *rpoB* de *Pseudomonas* U0306^T e as estirpes tipo de outras espécies de *Pseudomonas*. A evolução as distâncias foram calculadas pelo método TR: General Time Reversible. A porcentagem de replicar árvores nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados junto aos ramos.



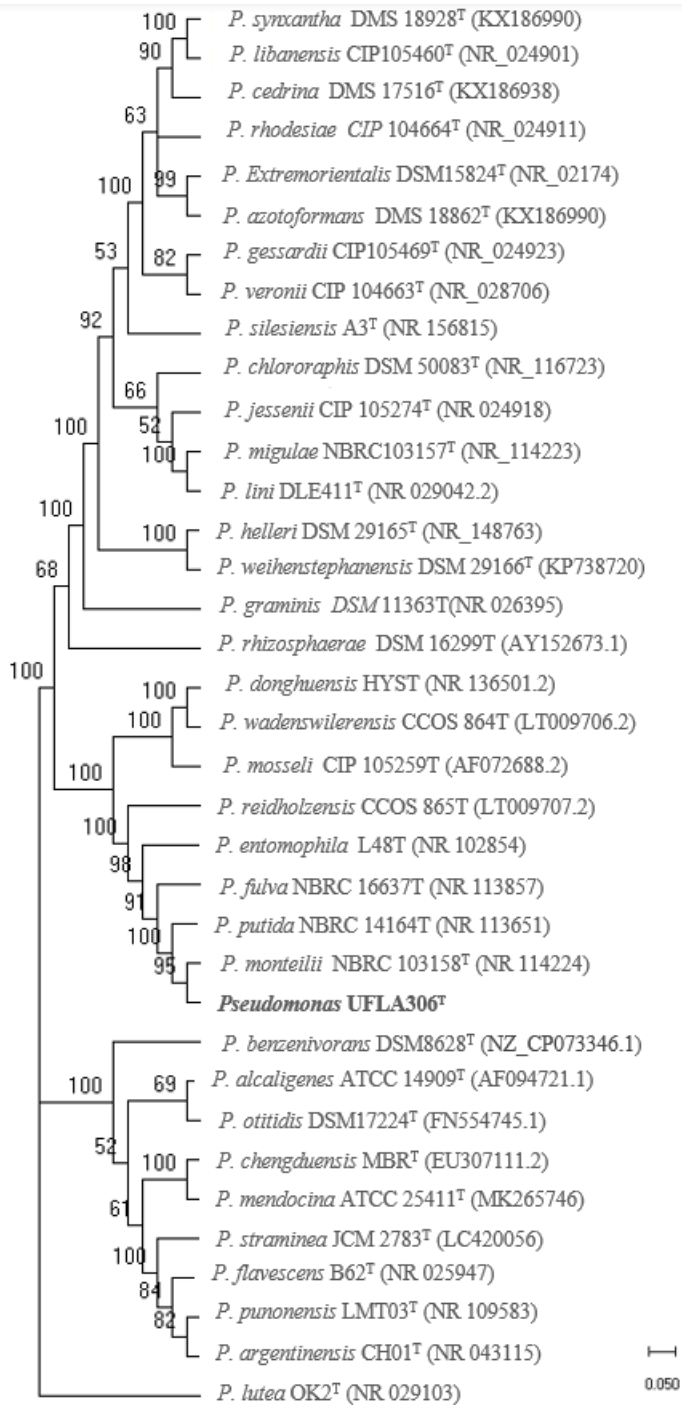


Figura S5. Árvore filogenética baseada no gene *rpoD* de *Pseudomonas* U0306^T e as estirpes tipo de outras espécies de *Pseudomonas*. A evolução as distâncias foram calculadas pelo método TR: General Time Reversible. A porcentagem de replicar árvores nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostrados junto aos ramos.