

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Taxonomia e Reclassificação de Estirpes dos
Gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum*
Pertencentes ao Centro de Recursos Biológicos
Johanna Döbereiner**

Natália dos Santos Ferreira

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA -
CIÊNCIA DO SOLO**

**TAXONOMIA E RECLASSIFICAÇÃO DE ESTIRPES DOS GÊNEROS
AZOSPIRILLUM E *NITROSPIRILLUM* PERTENCENTES AO CENTRO
DE RECURSOS BIOLÓGICOS JOHANNA DÖBEREINER**

NATÁLIA DOS SANTOS FERREIRA

Sob a Orientação do Professor
Jerri Édson Zilli

e Coorientação do Professor
Fernando Hayashi Sant'anna

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora**, no
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de Concentração em
Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Novembro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S383t	Ferreira, Natália dos Santos, 1992- Taxonomia e reclassificação de estirpes do gênero <i>Azospirillum</i> e <i>Nitrospirillum</i> pertencentes ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner / Natália dos Santos Ferreira. – Seropédica, 2022. 102 f. : il. Orientador: Jerri Édson Zilli. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo, 2022. 1. Taxonomia. 2. <i>Azospirillum</i>. 3. <i>Nitrospirillum</i>. 4. Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner. 5. Reclassificação. I. Zilli, Jerri Édson, 1974-, orient. II. Sant'Anna, Fernando Hayashi, 1984-, coorient. III. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo IV. Título.
-------	---

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 23 / 2022 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.074352/2022-48

Seropédica-RJ, 06 de dezembro de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA ? CIÊNCIA DO SOLO

NATÁLIA DOS SANTOS FERREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia ? Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

TESE APROVADA EM 29/11/2022.

Jerri Édson Zilli. Dr. EMBRAPA

(Orientador)

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Veronica Massena Reis. Dra. EMBRAPA

Evelise Bach. Dra. UFRGS

Fátima Maria de Souza Moreira. Dra. UFLA

(Assinado digitalmente em 07/12/2022 06:21)

IRENE DA SILVA COELHO
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: 1815763

(Assinado digitalmente em 06/12/2022 11:24)

JERRI EDSON ZILLI
CPF: 927.881.579-91

(Assinado digitalmente em 07/12/2022 09:42)

VERÔNICA MASSENA REIS
CPF: 631.052.847-53

(Assinado digitalmente em 06/12/2022 14:54)

FATIMA MARIA DE SOUZA MOREIRA
CPF: 332.145.907-82

(Assinado digitalmente em 06/12/2022 11:33)

EVELISE BACH
CPF: 003.572.890-64

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **23**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **06/12/2022** e o código de verificação: **20dc32cb40**

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese aos meus pais
Maria Anizia e Pedro Ferreira.
Meus irmãos Cleber, Aldenora e Charles.
Meus sobrinhos M. Eduarda, João Pedro, Helena e Renzo, minhas paixões!
Ao meu amor, companheiro de toda essa caminhada Eudys Thiago
A minha filha Akyra Rocha Ferreira Araújo,
Que é a realização do meu maior sonho, ser “Mamãe”.
Hoje conheço bem a plenitude do amor!
E principalmente a mim mesma, por ter acreditado e lutado pela realização deste momento
em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que esteve e continua comigo em todo tempo.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), o Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo e Embrapa Agrobiologia pela formação e desenvolvimento de minhas atividades.

A CAPES pelo suporte financeiro à pesquisa, através da concessão de bolsa.

Ao meu orientador Dr. Jerri Édson Zilli e co-orientador Fernando Hayashi Sant'anna, pelas grandiosas colaborações e ensinamentos transmitidos, ambos sempre me ajudaram nas horas mais difíceis (até mesmo fora de horário), só tenho a agradecer-lhes por tudo.

Aos pesquisadores da Embrapa Agrobiologia por compartilharem seus conhecimentos em especial: José Ivo Baldani, Márcia Vidal, Jean Luíz Simões, Stefan Shwab, Luc Rouws, Janaína Rouws e Verônica Massena Reis.

Ao professor Marcos Gervasio Pereira, um grande incentivador do meu crescimento profissional, onde tive o prazer de compartilhar bons momentos acadêmicos e também ótimas conversas de amizade ao longo desta caminhada.

Ao Geraldo Baeta da Cruz, que é uma grande pessoa e excelente profissional, que muito me ajudou em momentos de sufoco, sempre encontrando ótimas soluções.

Ao técnico Wilson Cabral (Laboratório de gramíneas) pela grande amizade, aprendizados obtidos de sua longa experiência profissional e pelas boas conversas trocadas.

As analistas Carolina Nachi Rossie e Patrícia Gitahy e todos os bolsistas do Laboratório de genética e bioquímica pelo apoio incondicional recebido ao longo de minhas atividades.

À equipe de apoio aos experimentos da Embrapa Agrobiologia, em especial ao Claudinho, Marildo e Roberto Carlos, Lúcio, Itamar Costa (Mazinho), Elaine.

Ao Itamar e Bento pelos ótimos pães de queijo multiplicados, os maravilhosos cafés, e é claro o enorme carinho recebido diariamente.

Aos meus amigos da Embrapa Amapá: Leandro, Nonato, Emília e Bené, que mesmo longe sempre se preocuparam comigo.

A minha amiga Adriane Lemos, “Cacau”, pelo ombro amigo e apoio incondicional.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana, que estiveram comigo ao longo de minha jornada em especial, João Luíz, que alegrava minhas manhãs com um grande sorriso e a frase “Oi Natália, a quanto tempo não te vejo”.

A minha outra grande amiga, Jaqueline Fernandes que me ajudou desde sempre no ambiente de trabalho e no dia-a-dia, me acolhendo em diversos momentos junto de sua família.

Aos meus colegas do Laboratório Centro de Recursos Biológicos- Johanna Döbereiner (CRB-JD) em especial analistas Fernanda Dourado, Natália Neutzling, Aline Macedo, Eliani, Carollo, Damaris Alencar, meus colegas Petter, Camila, Pascoal, Rafael Sanches, Jéssica, Layssa, Ana Lígia, Carol e Márcia, Edevaldo Castro.

A minhas queridas Bolsistas Rebeca e Amanda Maura que estiveram comigo na reta final deste trabalho (gostaria de ter tido, mais tempo com vocês!).

Aos meus amigos pessoais pelos diversos momentos vivenciados, alegria compartilhadas e muito carinho transmitido: Ao casal Luciano e Mari; Lili e Jardel (familiares), Marta Bahia. Áurea Lúcia, Karine Moura.

E a todos que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado durante a construção deste trabalho, digo que sou imensamente grata.

BIOGRAFIA

Natália dos Santos Ferreira, filha de Pedro Leal Ferreira e Maria Anizia Ramos dos Santos, nasceu no Distrito de Fazendinha, município de Macapá-AP, no dia 21 de maio de 1992. Passou sua infância neste lugar onde cursou o Ensino Fundamental na Escola Caetano dias Thomaz e seu Ensino Médio na Escola Estadual José do Patrocínio. Concluiu sua Graduação na Universidade Federal do Amapá, onde se diplomou Bacharel em Ciências Biológicas no ano de 2016. Durante seu período de graduação, foi bolsista de Iniciação Científica e de Extensão na Embrapa Amapá, sendo orientada pelos Pesquisadores Dr. Wardsson Lustrino Borges e Nagib Jorge Melém Júnior, aos quais foram incentivadores para busca do seu crescimento profissional. No ano de 2019 conquistou seu título de Mestre em Fitossanidade e Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO GERAL

FERREIRA, Natália dos Santos. **Taxonomia e reclassificação de estirpes do gênero *Azospirillum* e *Nitrospirillum* pertencentes ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner**. 2022. 102p. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2022.

O Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner - CRB-JD, é uma coleção de culturas pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB), existe oficialmente desde 1960, é mundialmente conhecido por manter uma alta diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, além de conter espécies microbianas com potencial para serem utilizadas em benefício da sociedade brasileira. Hoje seu acervo abriga cerca de (53) leveduras, (64) fungos filamentosos, (6060) bactérias de diversos gêneros. Grande parte da Coleção foi identificada por meio de características bioquímicas e morfológicas. No entanto, com base nos métodos moleculares atualmente aceitos na análise do genoma, ainda faltam informações taxonômicas sobre as cepas. Diante disso, o presente trabalho propôs, por meio de análise molecular, caracterizar uma parte da coleção de germoplasma para os gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum*. Ambos os gêneros possuem rizobactérias promotoras do crescimento vegetal com capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e produzir compostos benéficos para as plantas e estão presentes em diferentes condições edafoclimáticas. As análises moleculares foram baseadas em caracterizações filogenéticas combinadas (16S rRNA, *recA*); genômica (identidade nucleotídica média (ANI) com valores de circunscrição de 96% e linha de corte de hibridização digital DNA-DNA (dDDH) de 70%, proteoma central). As análises funcionais são definidas apenas para as espécies de *Azospirillum*, são baseadas em caracterizações fenotípicas e bioquímicas. Este trabalho originou duas propostas de reclassificação taxonômica, definidas como *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T e *Azospirillum argentinense* Az39^T, anteriormente classificadas como espécies pertencentes a *Azospirillum brasilense*. Além da classificação filogenética das cepas dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum*, evidenciando a alta diversidade entre cepas das espécies de ambos os gêneros, sugerindo a existência de novas espécies e acrescentando informações ao banco de dados desta coleção de estirpes erroneamente classificadas pertencentes a outros gêneros.

Palavras-chave: Coleção de culturas. Novas espécies. Reclassificação taxonômica. *Azospirillum*. *Nitrospirillum*.

GENERAL ABSTRACT

FERREIRA, Natália dos Santos. **Taxonomy and reclassification of strains of the genus *Azospirillum* and *Nitrospirillum* belonging to the Johanna Döbereiner Center for Biological Resources**. 2022. 102p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2022.

The Johanna Döbereiner Biological Resource Center - CRB-JD, is a culture collection belonging to the National Center for Research in Agrobiolgy (CNPAB), it has officially existed since 1960, it is world-renowned for maintaining a high diversity of nitrogen-fixing bacteria, in addition to containing microbial species that have the potential to be used for the benefit of Brazilian society. Today its collection houses about (53) yeasts, (64) filamentous fungi, (6060) bacteria of different genera. Much of the Collection was identified using biochemical and morphological features. However, based on currently accepted molecular methods in genome analysis, taxonomic information on the strains is still lacking. In view of this, the present work proposed, through molecular analysis, to characterize a part of the germplasm collection for the genus *Azospirillum* and *Nitrospirillum*. Both genera have plant growth-promoting rhizobacteria with the ability to fix atmospheric nitrogen and produce beneficial compounds for plants and are present in different edaphoclimatic conditions. Molecular analyzes were based on combined phylogenetic characterizations (16S rRNA, use of *recA* gene); genomics (average nucleotide identity (ANI) with circumscription values of 96% and DNA-DNA digital hybridization (dDDH) cut-line of 70%, core proteome). Functional analyses are defined only for *Azospirillum* species, are based on phenotypic and biochemical characterizations. This work originated two taxonomic reclassification proposals, defined as *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T and *Azospirillum argentinense* Az39^T, previously classified as species belonging to *Azospirillum brasilense*. In addition to the phylogenetic classification of strains of the genus *Azospirillum* and *Nitrospirillum*, evidencing the high diversity between strains of the species of both genera, suggesting the existence of new species and adding information to the database of this collection of wrongly classified strains belonging to other genera.

Keywords: Collection of cultures. New species. Taxonomic reclassification. *Azospirillum*. *Nitrospirillum*.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
μ(g, L)	Micro (grama, litro)
AIA	Ácido indol acético (auxina)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxiribonucleico)
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
h ou'	Hora (s)
Kb	Quilobase
Kv	Quilovolts
Kg	Kilograma
L	Litro
min ou''	Minuto (s)
n (g)	Nano (grama)
Pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
s ou '	Segundo
TAE	Tampão Tris-Acetato de EDTA
TAQ	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidade da enzima
V	Volt
W	Watts
ANI	Average Nucleotide Identity
NCBI	National Center for Biotechnology Information
dDDH	Digital DNA-DNA hybridization
OGRI	Overall Genome Relatedness Index

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore filogenética de Máxima verossimilhança baseada em sequências do gene 16S rRNA mostrando a posição de 220 estirpes de *Azospirillum* spp. em relação as estirpes tipo do gênero. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. A espécie *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T foi utilizada como grupo externo. A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos. Diferentes colorações determinam distintos clusters. 14
- Figura 2.** Árvore filogenética de Máxima verossimilhança baseada em sequências do gene *recA*, mostrando a posição de 167 estirpes do gênero *Azospirillum* spp. em relação as estirpes-tipo. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. *Herbaspirillum huttiense*^T foi utilizado como grupo externo. A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos. Diferentes colorações determinam distintos clusters. 15
- Figure. 3.** Maximum-Likelihood (using Jukes-Cantor substitution model) phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between the new strains and the type species (T) of the genus *Azospirillum*. Bootstrap values were inferred from 500 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. GenBank accession numbers are provided in parenthesis. *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T was included as the outgroup. The bar represents one substitution per 100 nucleotide positions..... 28
- Figure. 4.** Unrooted Maximum-Likelihood (using Jukes-Cantor methods) phylogenetic tree based on four concatenated sequences (*atpD*, *glnII*, *recA* and *rpoD*) showing relationships between Sp245^T-cluster, Sp7^T-cluster and CC-Nfb-7^T. The sequences of the genes were extracted from the genome listed in Table 4. Bootstrap values were inferred from 500 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. The bar represents one estimated substitution per 100 nucleotide positions. 29
- Figure 5.** Unrooted maximum likelihood (using Jukes-Cantor methods) phylogenetic tree based on sequences genes *atpD*, *glnII*, *recA* and *rpoD* showing relationships between Sp245^T-cluster, Sp7^T-cluster and CC-Nfb-7^T. Bootstrap values were inferred from 500 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. The bar represents the estimated substitution per 100 nucleotide positions. 30
- Figure 6.** Core-proteome phylogeny of *Azospirillum* species. The core-proteome rooted tree was constructed using the Neighbour-Joining method. *Bootstrap values 100%. Bar indicates the number of nucleotide substitution. 33
- Figure 7.** Genome clustering analysis of the ANIb values. Species clusters were defined according to a linkage criterion of $\geq 95\%$ of ANIb with $\geq 70\%$ of alignment coverage..... 34
- Figure 8.** Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of *A. argentinense* Az39^T with respect to closely related strains and several type strains within the genus *Azospirillum*. The Tamura Nei substitution model was used. Bootstrap values were inferred from 00 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. GenBank accession numbers are provided between brackets. *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T was included as the outgroup. The bar represents one substitution per 100 nucleotide positions. 54

Figure 9. Phylogenetic tree inferred from MLSA of *housekeeping* genes. a) Analysis of 92 aligned and concatenated *housekeeping* genes showing the position of *A. argentinense* Az39^T respect to other *A. argentinense* strains and several *A. brasilense*, *A. baldaniorum*, and *A. formosense* strains, including their type strains. *A. lipoferum* 59b^T was used as the root; b and c) Unrooted and rooted (outgroup: *Nitrospirillum amazonense* CBAmC) phylogenetic tree based on multiple concatenated alignments of 4 *housekeeping* genes (*atpD*, *glnII*, *recA*, and *rpoD*) showing the position of *A. argentinense* Az39^T respect to other *A. argentinense* strains and *A. brasilense* Sp7^T, *A. baldaniorum* Sp245^T, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T. Gene sequences were extracted from the genome listed in Table 3. Bootstrap values were inferred from 500 repeats and are indicated at tree nodes when $\geq 50\%$. The bar represents an estimated substitution per 100 nucleotide positions. 55

Figure. 10. Core-proteome phylogeny of *Azospirillum* strains and species showing the position of strain Az39^T with respect to closely related strains and all the type strains within the genus *Azospirillum*. The core-proteome rooted tree was reconstructed using the maximum-likelihood method. Bootstrap values were inferred from 1000 replicates. *Rhodospirillum centenum* SW ATCC 51521^T was included as the outgroup. 56

Figure 11. Genomic clusters detected using ProKlust, with pairwise ANIb values from the genomes. In the graph, the clusters have nodes corresponding to genomes and edges corresponding to ANI values above the cut-off for species delineation ($\geq 96\%$ of ANI). In the case of ANIb from pyANI, where an alignment coverage matrix was also generated, the edges additionally correspond to a reliable alignment between the set of genomes (50% of alignment coverage). The ProKlust analysis (network analysis) clearly shows the similarity of the strains Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, and MTCC4036 in comparison with the *A. baldaniorum* and *A. brasilense* clusters and other strains belonging to the genus *Azospirillum*. 59

Figure 12. Scanning electron microscopy images of strain Az39^T grown for 48h in NYA medium. Scale bar: left (5 μ m); right (1 μ m). 61

Figura 13. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança, sendo utilizado o modelo Jukes-Cantor baseada em sequências do gene 16S rRNA mostrando a posição de 162 estirpes do gênero *Nitrospirillum*. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 replica e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Como grupo externo se utilizou a *Herbaspirillum huttiense*^T A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos. 81

Figura 14. Árvore filogenética de Máxima verossimilhança baseada em sequências do gene *recA*, mostrando a posição de 162 estirpes de *Nitrospirillum*. em relação a estirpes tipo do gênero intimamente relacionadas. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Como raiz se utilizou a *Herbaspirillum huttiense*^T. A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos. Diferentes colorações representam distintos clados. 82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Informações gerais das estirpes de <i>Azospirillum</i> .	11
Table 2. Information of the strains used in the study.	26
Table 3. Characteristics of the studied genomes.	27
Table 4. Genomic metrics of <i>A. baldaniorum</i> (Sp245 ^T), <i>A. brasilense</i> (Sp7 ^T) and CC-Nfb-7 ^T with related strains.	32
Table 5. Differential characteristics of strains <i>A. baldaniorum</i> (Sp245 ^T and BR 12001) and related species of the genus <i>Azospirillum</i> : <i>A. brasilense</i> (Sp7 ^T) and strain <i>A. formosense</i> (CC-NFb-7 ^T).	35
Table 6. Biochemical features of <i>A. baldaniorum</i> strains and related species.	36
Table 7. <i>Azospirillum</i> species and strains used in the study.	51
Table 8. Characteristics of the studied genomes.	52
Table 9. Genomic metrics of <i>A. argentinense</i> Az39 ^T respect to strains of the same cluster and other type strains.	57
Table 10. Comparison of the cellular fatty acid contents (%) of strains within the genus <i>Azospirillum</i> .	62
Table 11. Biochemical characteristics of <i>A. argentinense</i> Az39 ^T strains and related <i>Azospirillum</i> species.	65
Table 12. Antibiotic sensitivity profile of <i>A. argentinense</i> Az39 ^T and related species.	67
Table 13. Physiological features of <i>A. argentinense</i> Az39 ^T and related strains and species.	68
Tabela 14. Informações gerais das principais característica de deposito das estirpes de <i>Nitrospirillum</i> .	79
Tabela 15. Genomas de <i>Nitrospirillum</i> utilizado neste estudo.	83
Tabela 16. Métricas Genômicas (matrizes) de oito genomas de <i>Nitrospirillum</i> .	84
Tabela 17. Características de depósito de <i>Azospirillum</i> spp e percentual de similaridade de nucleotídeos do gene <i>recA</i> , entre algumas estirpes tipo do gênero <i>Azospirillum</i> . <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T ; <i>A. argentinense</i> Az39 ^T ; <i>A. brasilense</i> Sp7 ^T ; <i>A. lipoferum</i> Sp59b ^T ; <i>A. palustre</i> B2 ^T ; 6- <i>A. mellinis</i> TMCY 552 ^T .	92
Tabela 18. Características das cepas pertencentes estudo depositadas como <i>Nitrospirillum</i> até a data de Julho/2018 e Percentual de similaridade de nucleotídeos dos gene <i>recA</i> , entre estirpes tipo do gênero <i>N. iridis</i> e <i>N. amazonense</i> BR 11142 ^T e BR 11145 ^T CBAmC.	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	3
2.1 Taxonomia Bacteriana	3
2.2 Índice Geral de Relação do Genoma (OGRI)	3
2.3 Mínimos Padrões Genômicos para a Taxonomia de Procariontes	5
2.4 Banco de Germoplasma - Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner	5
3. CAPITULO I CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE ESTIRPES DO GÊNERO <i>Azospirillum</i> PERTENCENTES AO CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS JOHANNA DÖBEREINER	7
3.1 RESUMO	8
3.2 ABSTRACT	9
3.3 INTRODUÇÃO	10
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.4.1 Estirpes bacterianas	11
3.4.2 Caracterização genética	11
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.6 CONCLUSÕES	17
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4. CHAPTER II GENOME-BASED RECLASSIFICATION OF <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 AS THE TYPE STRAIN OF <i>Azospirillum baldaniorum</i> SP. NOV.	20
4.1 RESUMO	21
4.2 ABSTRACT	22
4.3 INTRODUCTION	23
4.4 MATERIAL AND METHODS	24
4.4.1 Strain collection	24
4.4.2 16S rRNA and <i>housekeeping</i> genes phylogenetic reconstruction	24
4.4.3 Genome analyses	24
4.4.4 Phenotype and physiology of new species	25
4.5 RESULTS AND DISCUSSION	28
4.5.1 16S rRNA and <i>housekeeping</i> genes phylogenetic reconstruction	28
4.5.2 Genome analyses	31
4.5.3 Phenotype and physiology of new species	34
4.6 CONCLUSION	40
4.7 REFERENCES	41
5 CHAPTER III GENOME-BASED RECLASSIFICATION OF <i>Azospirillum brasilense</i> Az39 AS THE TYPE STRAIN OF <i>Azospirillum argentinense</i> sp. nov.	45
5.1 RESUMO	46
5.2 ABSTRACT	47
5.3 INTRODUCTION	48
5.4 MATERIAL AND METHODS	50
5.4.1 Strain collection	50
5.4.2 16S rRNA and <i>housekeeping</i> genes phylogenetic reconstruction	50

5.4.3 Genome analyses.....	50
5.4.4 Genomic metrics	53
5.4.5 Phenotype	53
5.5 RESULTS AND DISCUSSION.....	54
5.5.1 16S rRNA and <i>housekeeping</i> genes phylogenetic reconstruction.....	54
5.5.2 Genome analyses.....	56
5.5.3 Genomic metrics	57
5.5.4 Phenotype	60
5.6 CONCLUSION.....	69
5.7 REFERENCES	70
6. CAPÍTULO IV CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE ESTIRPES DO GÊNERO <i>Nitrospirillum</i> PERTENCENTES AO CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS JOHANNA DÖBEREINER.....	75
6.1 RESUMO.....	76
6.2. ABSTRACT.....	77
6.3 INTRODUÇÃO	78
6.4 MATERIAL E MÉTODOS	79
6.4.1 Estirpes bacterianas.....	79
6.4.2 Caracterização genética.....	79
6.4.3 Análises genômicas.....	80
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
6.6 CONCLUSÕES	85
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
7.CONCLUSÕES GERAIS	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	90
9. ANEXOS.....	92

1. INTRODUÇÃO GERAL

O forte crescimento populacional leva a uma maior demanda por alimentos. Neste contexto surge a preocupação por novas áreas para cultivo de alimentos, porém 33% dos solos mundiais encontram-se degradados (SAATH; FACHINELLO, 2018). Práticas que melhorem a estrutura e fertilidade do solo, bem como o desenvolvimento das culturas agrícolas veem sendo buscadas. Uma prática agrícola que tem proporcionado aumentos dos rendimentos da agricultura sem impactos negativos ao meio ambiente é a inoculação de microrganismos benéficos que interagem com os vegetais.

Uma das interações bem conhecida é a fixação biológica de nitrogênio (FBN) que ocorre entre determinados microrganismos com capacidade na fixação de nitrogênio, popularmente conhecidos como rizóbios, e determinadas espécies vegetais da família Leguminosae (RIVAS et al., 2009; HUNGRIA et al., 2013). Estima-se que a contribuição do aporte de N por processos naturais pela associação simbiótica entre os microrganismos e plantas contribua com 65% da entrada de N na Terra (HUNGRIA et al., 2013), demonstrando a importância desta interação simbiótica na redução do uso de fertilizantes gerando benefício econômico e ambiental, principalmente em cultivos agrícolas (RIVAS et al., 2009).

Nos últimos anos diversos estudos foram voltados para identificação e descrição de microrganismos para entendimento da vasta diversidade microbiana em diferentes habitats, uma vez que além da FBN alguns grupos de microrganismos se associam a diversas plantas em diferentes especificidades e mecanismos (HUNGRIA et al., 2007). Um dos principais grupos estudados para promoção do crescimento vegetal são os gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum*. Estes grupos de microrganismos são capazes de proporcionar melhor desenvolvimento e produtividade de diversas culturas agrícolas em condições de campo devido sua capacidade de metabolizar e produzir fitohormônios e mecanismos para regulação do crescimento vegetal (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

O gênero *Azospirillum* desde sua criação tem sofrido várias alterações com novas descrições de espécies, já o gênero *Nitrospirillum* ainda possui escassez de informações sobre descrição de espécies relacionadas a este gênero, abrigo apenas duas espécies até o momento.

Desde a década de 1980, com o surgimento de técnicas de biologia molecular que incluem análises de sequências do gene 16S rRNA, abordagens multigênicas, entre outras técnicas, um novo cenário tem sido demonstrado, pois tais técnicas têm proporcionado critérios mais precisos para a correta classificação de microrganismos (LABEDA et al., 2014).

Muitos microrganismos depositados em bancos de germoplasmas ainda possuem, descrição de espécies baseadas muitas vezes em caracteres morfológicos e bioquímicos que podem sofrer variação de acordo com os métodos utilizados para caracterização. Neste contexto pode-se considerar que existe uma classificação pouco precisa de isolados de *Azospirillum* e *Nitrospirillum*, baseados apenas em caracteres morfológicos e bioquímicos que levaram ao depósito de grande número de estirpes em coleções de depósitos biológicos as quais, nem sempre foram corretas sob o ponto de vista de identificação de espécie.

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar através de análises filogenômicas e funcionais estirpes do gênero *Azospirillum* e *Nitrospirillum* depositadas no Centro de Recursos Biológicos - Johanna Döbereiner (CRB-JD) da instituição Embrapa Agrobiologia.

A tese foi organizada em quatro capítulos, sendo eles:

- a) Capítulo I Classificação filogenética de estirpes do gênero *Azospirillum* pertencentes ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner.
- b) Capítulo II- Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov..
- c) Capítulo III- Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov..
- d) Classificação filogenética de estirpes do gênero *Nitrospirillum* pertencentes ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- (i) Efetuar análises moleculares para se obter o posicionamento filogenético de estirpes pertencentes ao gênero *Azospirillum* e *Nitrospirillum*.
- (ii) Posicionar taxonomicamente a estirpe *Azospirillum brasilense* Sp245^T, através de análises filogenômicas para compará-la com outras cepas estreitamente relacionadas, propor a reclassificação desta espécie para *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T.
- (iii) Esclarecer a posição taxonômica de Az39, através de análises filogenômicas e fenotípicas para compará-la com outras cepas estreitamente relacionadas, propor a descrição de uma nova espécie de *Azospirillum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 Taxonomia Bacteriana

A taxonomia bacteriana baseia-se no estudo da identificação, classificação e nomeação dos microrganismos bacterianos seguindo as regras internacionais estabelecidas pelo “*International Code of Nomenclature of Bacteria*” (DE LAJUDIE, et al 2017). Para uma adequada classificação de microrganismos diversas ferramentas são utilizadas a fim de conseguir atingir um consenso adequado sobre sua taxonomia. Essas ferramentas no passado eram baseadas em estudos denominados de análise polifásica, onde ocorrem certas integrações de dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos (TINDAL et al., 2010).

A taxonomia dos procariotos evoluiu rapidamente desde que a capacidade de obter sequências de genes, sendo desenvolvida, após a revolução biotecnológica e desenvolvimento da metodologia de sequenciamento pelo método Sanger e outras técnicas baseadas em biologia molecular. O uso da sequência do gene 16S rRNA é utilizado para gerar árvores filogenéticas evolutivas e esta metodologia melhorou a análise das relações entre as linhagens recém-obtidas e aquelas já descritas, possibilitando uma classificação mais rápida e precisa do que os métodos utilizados anteriormente. Uma das razões é a geração de um volume enorme de dados baseados em sequências genéticas e proteicas organizadas em bancos de dados virtuais, baseado no estudo da diversidade de microrganismos (KLENK; GOKER, 2010; SLATKO et al., 2018).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de sequenciamento de próxima geração (NGS) proporcionou a obtenção de sequências genômicas a preços acessíveis. Esses genomas atualmente estão sendo utilizados para substituir os métodos clássicos e tediosos de hibridização DNA-DNA, que era tido como um padrão “ouro” para caracterização procariótica, gerando diretamente valores in silico usando o índice geral de relação do genoma (OGRI), (CHUN et al., 2018)

2.2 Índice Geral de Relação do Genoma (OGRI)

O OGRI, é um termo genérico que designa o agrupamento de todos os métodos de bioinformática definidos para substituir a hibridização DNA-DNA (DDH) para a diferenciação de espécies de maneira reprodutível, esses métodos utilizam sequências de genoma completo (CHUN e RAINEY, 2014). Atualmente os OGRIs mais utilizado para avaliar a relação entre sequências genômicas são: identidade média nucleotídica (ANI) e DDH digital (dDDH). (CHUN et al., 2018).

a) Identidade média nucleotídica (ANI)

ANI, representa uma média de valores entre vários conjuntos de regiões ortólogas, que reflete a semelhança média percentual de informações genômicas compartilhadas em um par de genomas. O corte inicial proposto foi de 94% para corresponder ao tradicional 70% para DDH (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005). Posteriormente ajustado para 95-96% (GORIS et al., 2007). Konstantinidis; Tiedje (2005), utilizaram o algoritmo BLASTn para realizar alinhamentos (ANIb) (versão 2.2.5 ALTSCHUL et al., 1997). Uma versão mais recente está sendo utilizada (CAMACHO et al., 2009). Esse algoritmo utiliza pares de genomas, onde um par serve como consulta e outro como sequência de referência. O genoma de referência é mantido e o genoma de consulta é fragmentado. As regiões homólogas são consideradas como apresentando $\geq 30\%$ de identidade sobre $\geq 70\%$ de comprimento de alinhamento, fragmentos ≤ 1020 bp são usados na análise. Após sua criação foram realizadas diversas melhorias para uso

do ANI, logo a implementação do MUMmer software (ANIm), foi criada para obter resultados mais rápidos desta análise. Os alinhamentos de sequência são produzidos usando árvores de sufixos de várias sequências de referência ou consulta. Para comprimentos de alinhamento, são realizadas pontuações baseadas na distância de toda a região entre inserções ou exclusões, posteriormente o número de sítios não idênticos do comprimento de alinhamento são subtraídos e a porcentagem de identidade de nucleotídeo para cada fragmento é então determinada (KURTZ et al., 2004).

Distintos algoritmos foram desenvolvidos, visando a melhoria do tempo de cálculo e maior precisão no valor definido para o limite de circunscrição de espécie entre alguns deles pode-se citar: ANI baseado em BLAST-ANIb (94%, KONSTANTINIDIS & TIEDJE (2005), 95-96 % GORIS et al., 2007, ANI baseado em MUMmer-ANIm 95-96 %, KURTZ et al., 2004) ou ANI baseado em genes ortólogos OrthoANIb (95-96%, LEE et al., 2018); OrthoANIu (95%, YOO et al., 2017); gANI (96%, VARGHESE et al., 2015) e muitos outros relatados por Palmer et al., 2020 e Sant'Anna et al., 2019. A implementação de cada software pode ser diferente, essas diferenças podem ser encontradas até mesmo quando diferentes programas de computador usam o mesmo algoritmo. Logo, a determinação de uma métrica universal ou espécie de corte ANI é inviável. As interpretações apropriadas dos ANIs devem ser dependentes da metodologia usada para determiná-los, e a história evolutiva dos táxons sendo investigado (PALMER et al., 2020).

b) Hibridização DNA-DNA (DDH)

A hibridização DNA-DNA (DDH), foi desenvolvida na década de 1960, refere-se a uma técnica biológica molecular que determina o grau de similaridade entre combinações de sequências de DNA (MCCARTHY e BOLTON, 1963). Resumidamente o método realiza o cisalhamento do DNA de duas linhagens gDNA do organismo testado e do gDNA do organismo de referência, em pequenos fragmentos (600-800 bp), aquecendo a mistura para a dissociação da fita dupla do DNA. Posteriormente se diminui a temperatura para reassociação de fragmentos sendo, esses procedimentos são demorados e trabalhosos (AUCH et al., 2010; SANTANNA et al., 2019).

Na prática, existem vários métodos de determinação de DDH, que se diferenciam de laboratório para laboratório, porém são todos baseados no mesmo princípio. Essa variação implica muitas vezes em resultados diferenciados. A vista disso, há anos existe um interesse crescente em substituir a DDH por métodos mais reprodutíveis e absolutos que não requeiram o uso sucessivo de estirpes de referência (AUCH et al., 2010).

Os progressos tecnológicos de sequenciamento genômico, possibilitaram o desenvolvimento de métodos de rotina para o delineamento de espécies através de análises *in silico*. A taxonomia bacteriana, baseou-se fortemente em medições comparativas que calculam substitutos DDH *in silico* diretamente entre sequências de genomas. Tal análise fornece um limite numérico claro e objetivo valores < 70% garantem a atribuição das duas estirpes a espécies diferentes, valores maior ou igual a essa porcentagem as duas estirpes são consideradas pertencentes à mesma espécie (KÄMPFER E GLAESER 2012; CHUN e RAINEY, 2014).

Para análise sobre substituições *in silico* para DDH, critérios de otimização foram usados tais como regressão e/ou correlação com valores de métodos digitais (dDDH). Atualmente uma abordagem utilizada para essa correlação é o uso do Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP), uma inferência de árvores ou redes filogenéticas de um determinado conjunto de genomas totalmente (ou mesmo incompletamente) sequenciados e os valores digitais refletem com sucesso os resultados de hibridização DNA-DNA de laboratório. O GBDP, pode ser utilizado por meio de um serviço web gratuito em <http://ggdc.dsmz.de>, para enviar pares de genomas e receber análogos de DDH, bem como estimativas de DDH baseadas

em modelos (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013). Por sua vez para o uso do dDDH, recomenda-se, o uso da fórmula d_6 , que parece se aproximar mais das propriedades esperadas para os valores de DDH determinados experimentalmente (AUCH et al., 2010; LI et al., 2015).

2.3 Mínimos Padrões Genômicos para a Taxonomia de Procariontes

Na literatura existe a recomendação do uso de dados genômicos, como um padrão necessário taxonomia bacteriana. O International Committee on Systematics of Prokaryotes, endossa que os objetivo dos padrões mínimos é fornecer orientação sobre a descrição de táxons para taxonomistas que buscam tal aconselhamento, sendo que estes padrões devem seguir as tecnologias atuais, as quais muitos deles devem estar relacionados a dados de sequência (de LAJUDIE & YOUNG, 2017).

Não existe diretrizes que englobe unicamente todas as bactérias, todavia existem recomendações que incluem amplamente recomendações e critérios aplicáveis, definidas para grupos específicos. Consideramos que a definição proposta por de Lajudie et al. (2019), definida par uma descrição adequada de um novo gênero ou espécie de rizóbio ou agrobactéria, seguem padrões mínimos necessários para uso de dados genômicas em taxonomia de procariontes. Onde os seguintes padrões são necessários.

- (1) Uma sequência de genoma deve estar disponível para a cepa-tipo.
- (2) Evidências de diferenciação de outras espécies devem ser fornecido e ser baseado em sequências do genoma do estirpes do tipo.

As sequências do genoma mesmo que incompletas devem seguir o mínimo proposto por Chun et al., 2018:

a) A montagem do genoma deve ser descrita em detalhe, pelo menos as seguintes estatísticas devem ser fornecidas: i) o tamanho do genoma obtido, (ii) Razão DNA G+C, (iii) o número de contigs, (iv) N50 e (v) a profundidade de cobertura do sequenciamento. A profundidade de 50X é recomendada para (Illumina, Ion Torrent e plataformas de sequenciamento de DNA da Pacific Biosciences). Contaminações devem ser verificadas. A sequência 16S das estirpes-tipo proposto, deve ser determinado pelo método de sequenciamento de Sanger. A sequência do 16S, extraída do genoma completo sempre deve ser comparada com a do Método Sanger.

b) Para a proposta de novas espécies, os valores OGRI devem ser obtidos através de cálculos contendo todas as espécies filogeneticamente relacionada. Pelo menos 30 genes devem ser considerados para definição filogenômica quando relacionando a classificação de gêneros ou táxons superiores. A montagem final do genoma deve ser acessível publicamente depositada em um banco de dados aberto.

2.4 Banco de Germoplasma - Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner

O Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner - CRB-JD, é uma coleção de cultura pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), situada no município de Seropédica-RJ. Este centro, teve seu início na década de 1960, liderado pela pesquisadora Johanna Döbereiner. É reconhecido mundialmente por manter alta diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio. Possui credenciamento no Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento como banco de germoplasma oficial para manter microrganismos de interesse agrícola, sendo também considerado um dos membros brasileiros mais antigas da World Federation for Culture Collections (WFCC coleção 364). Contém espécies microbianas que têm potencial para serem utilizadas em benefício da sociedade brasileira. As estirpes bacterianas e fúngicas são

preservadas através de métodos de armazenamento de longo prazo, permitindo que as gerações futuras usem essas espécies (ALELO MICRO, 2021).

Essas técnicas são baseadas em: criopreservação (código verificador 0764143, código CRC 6BFA1F5D) , preservação em tubo sob óleo mineral (código verificador 0768895, código CRC A67DA76C) e preservação por liofilização (código verificador 0790076, código CRC 1AEFDCAB), os protocolos estão disponibilizados em https://sei.sede.embrapa.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0.

O CRB-JD tem como principal objetivo, manter um banco de recursos genéticos microbianos, realizar intercâmbios, enriquecer a coleção com a introdução de novos organismos, desenvolver insumos biológicos e capacitar acadêmicos e profissionais em geral. As atividades relacionadas à coleção seguem requisitos mínimos de qualidade, incluindo um sistema para monitorar a viabilidade e pureza do estoque e registrar suas atividades de rotina. Todos os dados relativos a cada acesso são organizados no Sistema de Informação de Recursos Genéticos da Embrapa Alelo, um subsistema da AleloMicro, sua coleção de germoplasma possui o acrônimo BR (ALELO MICRO, 2021). Sua página de consulta aberta disponível em: (<https://am.cenargen.embrapa.br/amconsulta/colecao/numeros?id=2>), apresentam os seguintes dados de depósitos (dados apresentados por linhagens) até a presente data:

- Principais microrganismos depositados: levedura (53), fungo filamentoso (64). Bactéria (6060).
- Percentual por Linhagens: Bactérias Diazotróficas Associativas e Endofíticas (5919), Fungos Micorrízicos Arbusculares e Endofíticos (47), Microrganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (211).
- Distribuição por Gênero: *Rhizobium* (1782), *Bradyrhizobium* (1180), *Paraburkholderia* (450), *Bacillus* (357), *Azospirillum* (339), *Nitrospirillum* (266), *Burkholderia* (262), *Gluconacetobacter* (242), *Herbaspirillum* (184), Outros (985).

3. CAPITULO I

CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE ESTIRPES DO GÊNERO *AZOSPIRILLUM* PERTENCENTES AO CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS JOHANNA DÖBEREINER

3.1 RESUMO

O gênero *Azospirillum* é composto por rizobactérias que são amplamente encontradas em diversos ambientes e possuem importância agrícola significativa, a maioria das espécies fixam nitrogênio e possuem consideráveis habilidades promotoras de crescimento vegetal. Neste estudo, conseguimos diferenciar *Azospirillum* spp. por meio da comparação da sequência do gene 16S rRNA e *recA* amplificados por PCR. Essa estratégia de amplificação do gene 16S rRNA e posteriormente análise via banco de dados do BLAST permitiu a identificação inequívoca de estirpes pertencentes ao gênero *Azospirillum*. As sequências obtidas do gene *recA* serviram para inferir a árvore filogenética do gênero, que por sua vez ajudou a classificar com sucesso 167 estirpes de *Azospirillum* spp., pertencentes a Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner, isoladas de diferentes regiões do Brasil, desde 1960. Além disso, foram descobertas diversas estirpes que podem representar novas espécies putativas. Os resultados demonstram que o sequenciamento gene *recA* é um método alternativo adequado considerado de baixo custo para a identificação molecular confiável de *Azospirillum* spp.

Palavras-chave: Filogenia. *Azospirillum*. Gene *recA*.

3.2 ABSTRACT

The genus *Azospirillum* is composed of rhizobacteria that are widely found in different environments and have significant agricultural importance, most species survive and have considerable plant growth promoting abilities. In this study, differentiate *Azospirillum* spp. by comparing the sequence of the 16S rRNA and *recA* gene amplified by PCR. This strategy of amplification of the 16S rRNA gene and subsequently followed through the BLAST database allowed an unequivocal identification of strains belonging to the genus *Azospirillum*. The sequences carried over from the *recA* gene served to infer the phylogenetic tree of the genus, which in turn helped to successfully identify 167 strains of *Azospirillum* spp. In addition, several strains were discovered that may represent new putative species. The results demonstrate that *recA* gene sequencing is a suitable alternative method considered from below for the reliable molecular identification of *Azospirillum* spp.

Keywords: Phylogeny. *Azospirillum*. *recA* gene.

3.3 INTRODUÇÃO

O Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner - CRB-JD, é uma coleção de cultura existente desde a década de 1960, criada pela ação pioneira da pesquisadora Johanna Döbereiner, microbiologista do solo que dedicou 50 anos de sua vida à pesquisa científica, sobretudo às pesquisas de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Seus primeiros estudos proporcionaram a descoberta em solos ácidos de *Azotobacter*. Posteriormente em rizosfera de gramíneas *Beijerinckia fluminensis* com cana-de-açúcar (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958) e *Azotobacter paspali* com *Paspalum notatum* cv. batatais (DÖBEREINER, 1966).

Os estudos voltados a FBN, ganharam visibilidade ao longo do tempo, e assim técnicas e métodos para descoberta de novos microrganismos foram desenvolvidos tais como: redução de acetileno, meio semi-sólido NFb, que possibilitava o isolamento de bactérias microaerófilas este meio permitiu o isolamento de duas novas espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* (BALDANI et al 2014). Diversas linhas de pesquisas com foco em aplicações agrícolas foram desenvolvidas e consequentemente, alguns aspectos da interação planta-bactéria começaram a ser elucidadas. Esses avanços científicos possibilitaram a descoberta de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio em plantas não-leguminosas, o que lhe valeu destaque em pesquisa de FBN em gramíneas no Brasil e em outros países. (BALDANI, BALDANI, 2005).

Hoje esse banco de germoplasma abriga uma diversidade de microrganismos muito dos quais grande parte foram isolados pela equipe liderada pela pesquisadora Johanna Döbereiner, no Centro Nacional de Ensino e Pesquisa Agropecuária do Ministério da Agricultura (EMBRAPA AGROBIOLOGIA). Dentre essa diversidade, as bactérias fixadoras de nitrogênio possuem grande relevância para o reconhecimento mundial deste centro. Os principais gêneros que estão preservados nesta coleção são: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Paraburkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Nitrospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, entre dezenas de outros (ALELO MICRO, 2021).

Vários gêneros são estudados, devido ao interesse por seu potencial como promotores de crescimento vegetal, notadamente por sua associação com plantas de importância econômica. O gênero *Azospirillum* é um dos mais bem estudados nas últimas décadas, atualmente é constituído por um total de 23 espécies reconhecidas e validadas e quatro espécies como nome não validados (<http://www.bacterio.net/azospirillum.html>). A poucos anos o gênero foi dividido em outras dois gêneros *Nitrospirillum* e *Niveispirillum*, através de análises polifásicas (LIN et al., 2014).

O forte crescimento em análises de genomas de procariotos tem proporcionado maior compreensão das espécies pertencentes ao gênero, que cada vez mais, são divididos em novas espécies, aprofundando os estudos de evolução. Neste trabalho, o grupo de pesquisa aprofundou a caracterização e a posição taxonômica de estirpes tradicionalmente estudadas no Brasil e Argentina. Com isso foram descritas as espécies *A. baldaniorum*, com a estirpe Sp245^T como estirpe tipo e *A. argentinense*, estirpe tipo Az39^T (FERREIRA et al., 2020; 2022).

Este capítulo propôs-se investigar com detalhes 220 estirpes bacterianas depositadas na coleção do CBR-JD, que foram isoladas de diferentes hospedeiros e locais. Foram utilizadas técnicas moleculares amplificação do gene 16S rRNA e *recA*, com o intuito de posicionar taxonomicamente estas estirpes ou obter uma caracterização mais aprofundada.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Estirpes bacterianas

O estudo inclui 220 estirpes de *Azospirillum* spp. sendo estes isolados de diferentes hospedeiros, parte da planta, solos, rizosfera e países diferentes (Tabela 1). Todos as estirpes são pertencentes ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (WDC364), Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro-Brasil (www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd). Essa representatividade de estirpes inclui bactérias depositadas desde 1960 até a data de junho/2018. As estirpes foram recuperadas seguindo o controle de qualidade e preservação de microrganismos regidas pelo CRJ-JD.

Tabela 1. Informações gerais das estirpes de *Azospirillum*.

País	Substrato	Hospedeiro	Nº Estirpes
Brasil	Rizosfera, raiz,	<i>Brachiaria brizantha</i>	3
Brasil	Rizosfera, raiz,	<i>Brachiaria decumbens</i>	9
Brasil	Rizosfera, raiz	<i>Brachiaria humidicola</i>	2
Estados Unidos	Solo	<i>Cynodon dactylon</i>	1
Rússia	Raiz	<i>Dactylis glomerata</i>	1
Brasil	Solo, rizosfera	<i>Digitaria decumbens</i>	2
Rússia	Raiz	<i>Festuca pratensis</i>	1
Argentina	Raiz	<i>Fragaria sp.</i>	1
Brasil	Raiz, folha	<i>Musa sp.</i>	21
Brasil	Raiz	<i>Oryza sativa</i>	5
Brasil	Raiz	<i>Pennisetum purpureum</i>	3
Rússia	Raiz	<i>Sorghum vulgaris</i>	2
Brasil, Alemanha, Argentina, Holanda	Raiz, rizosfera	<i>Triticum aestivum</i>	54
Algeria, Argentina, México, Brasil	Solo, raiz e rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	22
Brasil	Folha, raiz	<i>Ananas comosus</i>	3
Brasil		<i>Brachiaria sp.</i>	19
Brasil	Raiz	<i>Coffea arabica</i>	2
Brasil	Raiz	<i>Pennisetum purpureum</i>	28
Brasil	Raiz, rizosfera	<i>Sp</i>	3
Brasil, México, Argentina, Itália	Raiz, rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	38

3.4.2 Caracterização genética

a) Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de colônias puras, obtidas após crescimento em meio de cultura TY (Yeast-Tryptone) e/ou DYGS (Dextrose Yeast Glucose Sucrose), durante três dias a 30°C. Posteriormente alíquotas contendo 1 mL da cultura, foram transferidas para microtubos, seguindo de centrifugação a 12000 rpm por 3 min, sendo os pellets formados utilizados para extração do DNA. Para extração de DNA utilizou-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Cada DNA extraído foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (1.0 %), durante 90 minutos a 75 Volts, preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). As amostras foram aplicadas no gel sendo misturado 2 µL de tampão tipo Loading (2x) (concentração inicial 10x) e 2 µL de DNA

extraído. O gel foi corado com brometo de etídio. ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e descorados em água destilada durante 60 minutos.

b) Amplificação e sequenciamento dos genes

As reações de PCR foram preparadas usando como molde o DNA extraído dos isolados do grupo em estudo, utilizando o Kit Gotaq DNA polimerase (Promega) e dois genes codificadores: 16S rRNA e *recA*.

Para amplificação das regiões do gene 16S rRNA e *recA*, $1,0 \mu\text{L}$ de DNA cromossômico de cada estirpe em estudo, foi adicionado a um mix de PCR de $25 \mu\text{L}$: (1X buffer incolor; $1,75 \mu\text{M}$ MgCl_2 , $0,25 \mu\text{M}$ dNTP, $0,25 \mu\text{M}$ cada primer (16S rRNA) e $1,0 \mu\text{M}$ cada primer (*recA*), Taq DNA polimerase $1,25 \text{ U}$) e submetidos a etapa inicial de desnaturação de 2 min a 94°C seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 58°C por 45s depois a 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 5 min.

Os primers utilizados para o gene 16S rRNA foram: 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') e *recA* utilizou-se primer 63F (5'-ATCGAGCGGTCGTTTCGGCAAGGG-3') e 504R (5'-TTGCGCAGCGCCTGGCTCAT-3'), (Guant et al., 2001). Os produtos de amplificações foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose (1.5 %), durante 90 minutos a 75 Volts, preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). As amostras foram aplicadas no gel sendo misturado $2 \mu\text{L}$ de tampão tipo Loading (2x) e $2 \mu\text{L}$ de DNA extraído. O gel foi corado com brometo de etídio. ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e descorados em água destilada durante 60 minutos

c) Sequenciamento e análises filogenéticas

Os produtos de PCR foram sequenciados com o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1 v (Applied Biosystems – ABI) em sequenciador automático de DNA ABI 3730x1 (Applied Biosystems), seguindo o manual do fabricante. As sequências foram analisadas manualmente com a ajuda do software BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica). As sequências de todos os genes foram verificadas com análises de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997). Os Alinhamentos foram gerados usando a ferramenta Muscle (Edgar, 2004). As árvores filogenéticas foram realizadas usando o software MEGA 11 (Tamura et al., 2021), as topologias calculadas utilizando o método Maximum-Likelihood (ML), (Felsenstein, 1985), sendo usado o melhor modelo indicado pelo software o Jukes-Cantor. A confiabilidade da topologia das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando o método de bootstrap com 500 pseudoreplicatas.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a relação filogenética de 220 estirpes de *Azospirillum*, mantidos na Coleção de Culturas CRB-JD, sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA, foram amplificadas via PCR. Essas sequências foram analisadas via BLAST, para verificação de similaridade. Entre as estirpes analisadas, identificou-se e foram eliminadas 29 cepas que não pertenciam ao referido gênero sendo estas pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* (24), *Bacillus* (02), *Paenibacillus* (01), *Curtobacterium* (01) e *Methylobacterium* (01), as demais estirpes pertencem ao gênero *Azospirillum* com percentual de identidade maior que 97%. (dados não mostrados).

As sequências resultantes foram utilizadas para análise filogenética do gene 16S rRNA (1320 nt) usando estirpes-tipo de *Azospirillum* como referência. Como mostrado na Figura 1, a maioria das estirpes foram posicionados em 3 clados considerados maiores, sendo estes clados de *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T (similaridade de 98,63-100%), *A. brasilense* Sp7^T (98,23 a 100%) e *A. argentinense* Az39^T (98,45-100%). Vários pequenos clados também foram observados compartilhando identidade de nucleotídeos de 94,91% a 99,73% com outras cepas de referências (dados não mostrados). Na análise filogenética também é possível observar o baixo posicionamento de estirpes relacionadas com a espécie de *A. lipoferum* 59b^T, esta espécie assim como a espécie de *A. brasilense* Sp7^T são amplamente estudadas (MARONICHE et al., 2016).

O equívoco de classificação das 29 estirpes, provavelmente está relacionada à forma como as estirpes foram classificadas. No passado, essa classificação era baseada principalmente em características morfológicas e apenas algumas estirpes possuíam dados com base em sequências de 16S rRNA. Embora as características morfológicas contribuam para a separação das estirpes, as informações obtidas podem ser tendenciosas, levando a resultados e interpretações errôneas. Até mesmo análises realizadas apenas com base em relações filogenéticas do gene 16S rRNA, podem ser consideradas não confiável para distinguir espécie. (MARONICHE et al., 2016).

Várias limitações ao uso de sequências de 16S rRNA na taxonomia procariótica são reconhecidas. Primeiro, sua lenta taxa de evolução pode dificultar a distinção entre espécies recentemente divergidas ou estreitamente relacionadas (FOX et al., 1992). Uma segunda limitação é o fato de alguns genomas são compostos por múltiplos genes de 16 rRNA não idênticos. Um estudo de PEI e colaboradores usando 883 genomas procarióticos encontrou até 15 cópias por genoma com uma diversidade intragenômica média de 0,55% ± 1,46% (PEI et al., 2010).

A fim de aprofundar a análise filogenética das linhagens estudadas, o gene *recA* foi amplificado, mas apenas 167 linhagens foram usadas para esta caracterização. Essa metodologia foi adotada devido a problemas de não amplificação ou sequenciamento. Como pode ser visto na Figura 2, a árvore filogenética do gene *recA*, permitiu distinguir claramente as posições das estirpes investigadas, principalmente para 5 expressivos clados.

Sendo que 33 estirpes foram agrupadas próxima às estirpes de *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T (97,23-100% de identidade), 32 próximas a *A. brasilense* Sp7^T (97,77 a 100% de identidade), 30 próximos a *A. argentinense* Az39^T (97,50-100% de identidade), 17 próximos a *A. palustre* B2^T (98,75-100% de identidade), 16 próximos a *A. mellinis* (98,06-100% de identidade). Um resultado considerado surpreendente é a não existência de estirpes relacionadas intimamente com a espécie de *A. lipoferum* 59B^T, espécie de *Azospirillum* amplamente estudada. (Tabela 17).

A ramificação de *A. baldaniorum* Sp245^T inclui a cepa BR12001 compartilhando 97,49% de identidade nucleotídica. As estirpes BR 11017, BR11019, BR11649, 11002, foram agrupados no clado de *A. brasilense* Sp7^T respectivamente com as similaridades de 99,73%,

98,78%, 99,45% e 100% 98,63 a 100 % e as estirpes BR 12242 (REC3), BR 11975 são pertencentes ao clado de *A. argentinense* Az39^T com similaridade de 97,77% a 99,39%.

Essas estirpes já foram descritas em outros estudos, como pertencentes as referidas espécie através de análises de genes *housekeeping* e filogenômicas (FERREIRA et al., 2020,2022). Logo as informações de estirpes classificadas e já publicadas dessas espécies, contribuíram na interpretação e definições dos grupos, indicando que existe um consenso adequado para pressuposições estabelecidas de filogenia para *Azospirillum* spp.

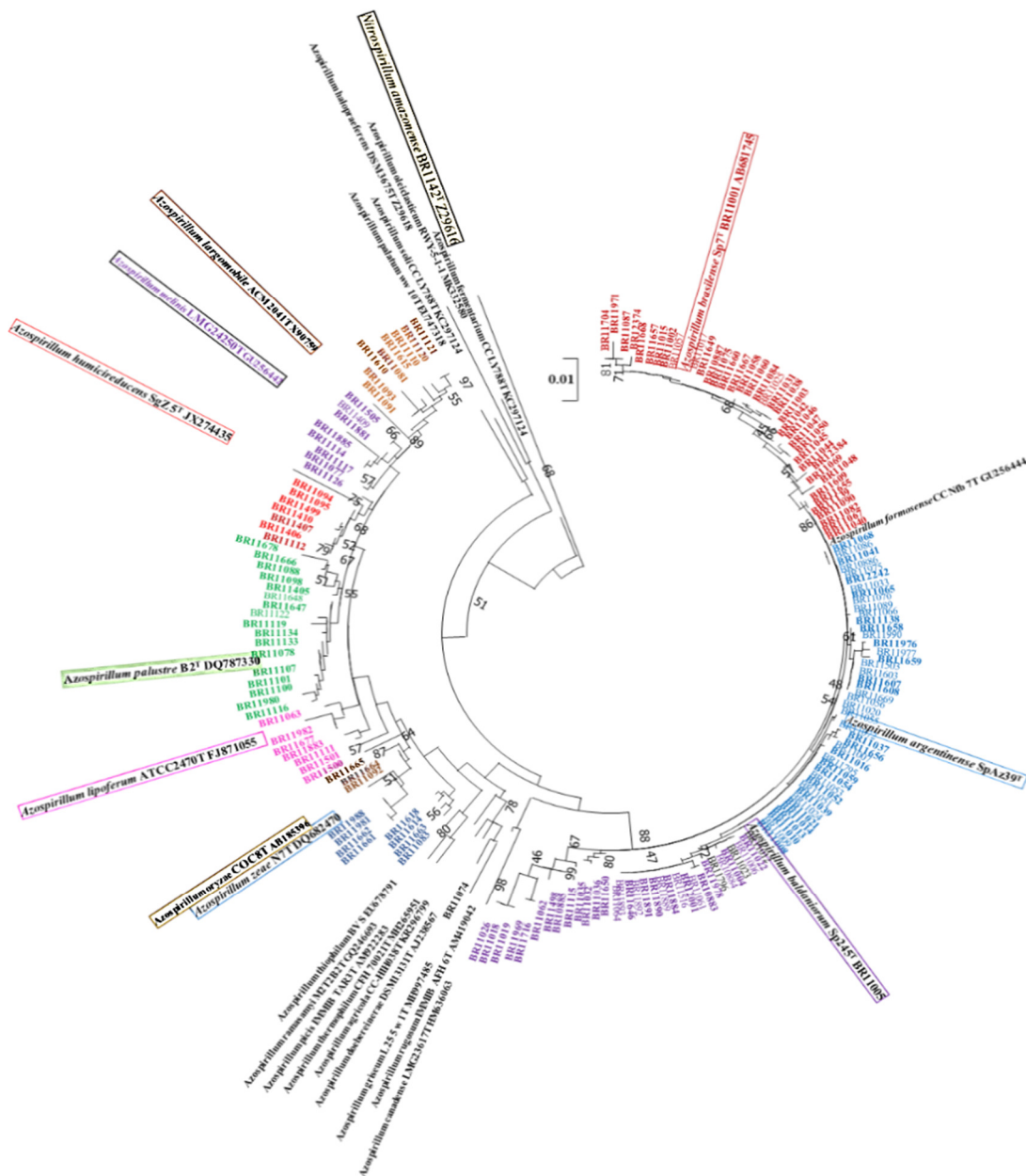


Figura 1. Árvore filogenética de Máxima verossimilhança baseada em sequências do gene 16S rRNA mostrando a posição de 220 estirpes de *Azospirillum* spp. em relação as estirpes-tipo do gênero. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. A espécie *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T foi utilizada como grupo externo. A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos. Diferentes colorações determinam distintos clusters.

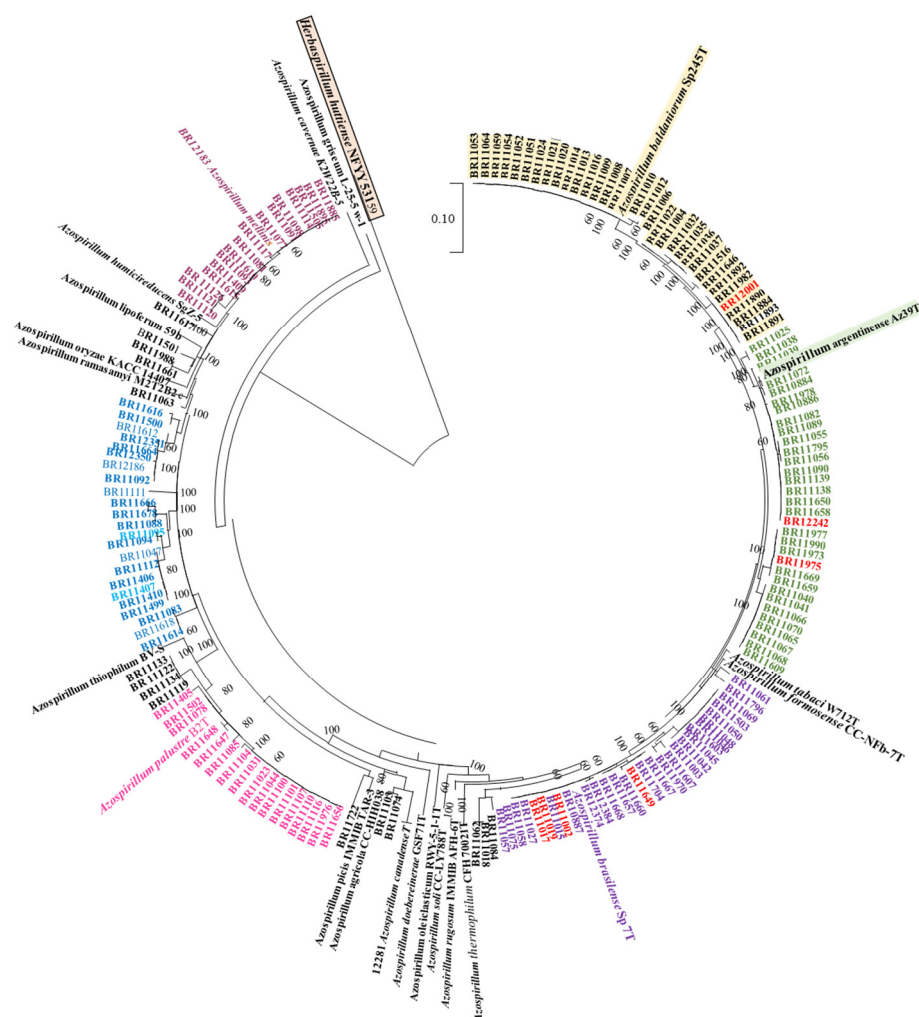


Figura 2. Árvore filogenética de Máxima verossimilhança baseada em sequências do gene *recA*, mostrando a posição de 167 estirpes do gênero *Azospirillum* spp. em relação As estirpes-tipo. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. *Herbaspirillum huttiense*^T foi utilizado como grupo externo. A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos. Diferentes colorações determinam distintos clusters.

A complexidade de espécies dentro do gênero *Azospirillum*, podem ser associadas ao seu potencial para dispersão cosmopolita microbiana e transferência horizontal (HTG ou THG) promíscua de genes (CALDERA et al., 2019). Vários estudos têm reconhecido o HGT como uma força motriz na adaptação procariótica e sobrevivência nos diferentes ecossistemas. Essa transferência é comumente relacionada a espécie estreitamente relacionadas e menos comum, em espécies com posição taxonômica mais distante (TIWARI; BAE, 2020).

Alguns estudos indicam que uma ampla distribuição de microrganismos pode estar associada à sua capacidade metabólica e resistências ao estresse e até mesmo vinculadas a expansão de transportadores o que contribui para possíveis diferenças ecológicas entre espécie (ZHANG et al., 2021), isso pode ser um fator determinante para evidencição dos clados apresentados neste estudo.

Alguns trabalhos indicam que o uso de gene monogênicos podem ser uma alternativa viável para discriminações rápidas de espécies (TORRIANI, DELLAGLIO, 2001). No entanto

ainda é fortemente enfatizado que essa discriminação é melhor obtida quando se utiliza a *Multilocus sequence analysis* (MLSA) de genes (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Outros autores consideram que a diferenciação entre espécies deve ser avaliada usando metodologias baseadas em genômica (DE LLAJUDIE et al., 2019).

Até o presente momento, não existe um limiar de corte para inferência filogenética quando se utiliza o gene *recA* para classificação procariótica. Todavia nossos resultados mostram uma faixa de 97,23 a 100% como percentual de identidade adequado. Em estudos realizados por Torriani, Dellaglio (2001), o gene *recA* foi utilizado para diferenciar *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus paraplantarum* com faixa de valores de identidade de 83,5 a 86,7%. No trabalho de LADETA et al., 2011, a qual utilizou primers degenerados para amplificar um fragmento do gene *recA*, foi possível discriminar estirpes de estafilocócica da carne com faixas de similaridade variando de 77 a 89%.

Este gene pode ter um duplo potencial como marcador filogenético: sua sequência de aminoácidos pode ser usada para inferir filogenias entre táxons distantemente relacionados, evitando assim as desvantagens dos rRNAs, em superestimação do parentesco de espécies com frequências de nucleotídeos semelhantes, bem como a não independência de padrões de substituição em locais diferentes e viés derivados de diferentes conteúdos de GC dos organismos (TORRIANI, DELLAGLIO, 2001).

A clara separação obtida com sequências gênicas curtas do gene *recA*, confirma a possibilidade este gene ser utilizado como marcador filogenético para espécies intimamente relacionadas e abre novas possibilidades para identificação de espécie de *Azospirillum* importantes para práticas agrícolas. Neste trabalho avanços significativos concernentes ao estudo de biologia molecular dessas espécies pertencentes a este banco de germoplasma foram mais bem compreendidas, todavia para que esses estudos sejam concretizados os mesmos devem ser intensificados.

3.6 CONCLUSÕES

O uso de 16S rRNA apresenta limitações para a identificação de espécies intimamente relacionadas, especialmente para grupos com alta complexidade genômica como o gênero *Azospirillum*. A análise filogenética do gene *recA*, permitiu maior poder discriminatório das linhagens estudadas, classificou estirpes próximas e identificou indícios de grupos filogenéticos que podem representar novas espécies putativas.

Assim foi possível classificar a coleção histórica de *Azospirillum* sp., estirpes mantidas no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner desde 1960. Até que o sequenciamento de todo o genoma seja viável e de baixo custo para que seja amplamente utilizado como método padrão na identificação de procariotos.

A classificação baseada em análise monogênica mostrado aqui, através da utilização do gene *recA*, se destaca como um método relativamente confiável e economicamente baixo para identificar rapidamente novos isolados de *Azospirillum*.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALELO MICRO CONSULTAS **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)**,
Seção **Dados** **Gerais** **(2021)** Disponível em:
<https://am.cenargen.embrapa.br/amconsulta/colecao/numeros?id=2>; Acesso em 21/10/2022.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, n. 17, p. 3389-3402. 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Ciênc.** 2005; 77:549-579. 2005.

BALDANI, J. I.; VIDEIRA, S. S.; DOS SANTOS TEIXEIRA, K. R.; REIS, V. M.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; SCHWAB, S.; HARTMANN, A. **The family rhodospirillaceae. In The prokaryotes.** Springer, Berlin, Heidelberg. 2014. pp. 533-618.

CALDERA, E. J.; CHEVRETTE, M. G.; MCDONALD, B. R.; CURRIE, C. R. Local Adaptation of Bacterial Symbionts within a Geographic Mosaic of Antibiotic Coevolution. **Appl. Environ. Microbiol.** Nov 27; 85(24):e01580-19. 2019.

DE LAJUDIE, P. M.; ANDREWS, M.; ARDLEY, J.; EARDLY, B.; JUMAS-BILAK, E.; KUZMANOVIĆ N. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** Jul. 69(7):1852-1863. 2019.

DÖBEREINER J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. **Pesq. Agropec. Bras.** 1: 357-365. 1966.

DÖBEREINER. J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Rev. Biol.** 1: 261-272. 1958.

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

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

FERREIRA, N. D. S.; CONIGLIO, A.; PUENTE, M.; SANT'ANNA, F. H.; MARONICHE, G.; GARCIA, J.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; VOLPIANO, C. G.; AMBROSINI, A. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 72:5475. 2022.

FERREIRA, N. D. S.; HAYASHI SANT' ANNA, F.; REIS, V. M.; AMBROSINI, A.; GAZOLLA VOLPIANO, C.; ROTHBALLER, M.; SCHWAB, S.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; PEDROSA, F. O. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 70:6203-6212. 2020.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. **International Journal of Systematic Bacteriology** 42(1), 166-170. 1992.

GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, A. S.; YOUNG, J. P. W. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **Int Jor Syst Evol Microbiol.** v. 51, p. 2037-2048. 2001.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Análise de sequência multilocus (MLSA) em taxonomia procariótica. **Microbiologia Sistemática e Aplicada** 38(4), 237-245. 2015.

LANDETA G.; REVERÓN, I.; ALFONSO, V.; CARRASCOSA, B.; LAS ROSARIO, R. M. Use of *recA* gene sequence analysis for the identification of *Staphylococcus equorum* strains predominant on dry-cured hams. 28(6), 1205-1210. 2011.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; SHAHINA, M.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek** 105:1149-1162. 2014.

MARONICHE, G. A.; GARCÍA, J. E.; SALCEDO, F.; REUS, M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers. **Microbiol. Res.** 195:1-10. 2017.

PEI, A. Y.; OBERDORF, W. E.; NOSSA, C. W.; AGARWAL, A.; CHOKSHI, P.; GERZ, E. A.; JIN, Z.; LEE, P.; YANG, L.; POLES, M.; BROWN, S. M.; SOTERO, S.; DESANTIS, T.; BRODIE, E.; NELSON, K.; PEI, Z. Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. **Applied and Environmental Microbiology.** 76(12), 3886-3897. 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution** 2021.

TIWARI, P.; BAE, H. Horizontal Gene Transfer and Endophytes: An Implication for the Acquisition of Novel Traits. **Plants (Basel)** Mar 1;9(3):305. 2020.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. **Applied and Environmental Microbiology** 67(8). 2001.

ZHANG, D.; ZHU, Z.; LI, Y.; LI, X.; GUAN, Z.; ZHENG, J. Comparative Genomics of *Exiguobacterium* Reveals What Makes a Cosmopolitan Bacterium. **M. Systems** Aug 31;6(4):e0038321. 2021.

4. CHAPTER II

GENOME-BASED RECLASSIFICATION OF *AZOSPIRILLUM* *BRASILENSE* SP245 AS THE TYPE STRAIN OF *AZOSPIRILLUM* *BALDANIORUM* SP. NOV.

Capítulo publicado como artigo no “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology”.

FERREIRA, N. D. S.; HAYASHI SANT' ANNA, F.; REIS V. M.; AMBROSINI, A.; GAZOLLA VOLPIANO, C.; ROTHBALLER, M. S. C.; WAB, S.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; PEDROSA, F. O.; et al. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 70:6203-6212. 2020.

4.1 RESUMO

Azospirillum sp. a cepa Sp245^T, originalmente identificada como pertencente a *Azospirillum brasilense*, é reconhecida como uma rizobactéria promotora de crescimento de plantas devido à sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e de produzir compostos benéficos para as plantas. *Azospirillum* sp. Sp245^T e outras estirpes relacionadas foram isoladas da superfície das raízes de diferentes plantas no Brasil. As células são Gram-negativas, bastonetes curvos ou ligeiramente curvos e móveis com flagelos polares e laterais. Sua temperatura de crescimento varia entre 20 °C a 38 °C e sua utilização da fonte de carbono é semelhante a outras espécies de *Azospirillum*. Uma análise preliminar da sequência de 16S rRNA mostrou que a nova espécie é estreitamente relacionada a *A. brasilense* Sp7^T e *A. formosense* CC-Nfb-7^T. Genes de manutenção revelaram que *Azospirillum* sp. Sp245^T, BR 12001 e Vi22 formam um cluster separado da cepa *A. formosense* CC-Nfb-7^T, e um grupo de estirpes intimamente relacionadas a *A. brasilense* Sp7^T. Índice geral de parentesco do genoma (OGRI) - análises estimadas com base na identidade de média de nucleotídeos (ANI) e hibridização digital de DNA-DNA (dDDH) - entre *Azospirillum* sp. Sp245^T e seus parentes próximos de outras estirpes do tipo *Azospirillum*, como *A. brasilense* Sp7^T e *A. formosense* CC-Nfb-7^T, revelaram valores abaixo do limite de circunscrição de espécies. Além disso, a filogenia do core-proteoma incluindo 1.079 proteínas comuns compartilhadas mostrou a clusterização independente de *A. brasilense* Sp7^T, *A. formosense* CC-Nfb-7^T e *Azospirillum* sp. Sp245^T, uma descoberta que foi corroborada pelo agrupamento do genoma de valores de OGRI e filogenias de manutenção. O conteúdo de DNA G+C do cluster de Sp245^T foi de 68,4-68,6%. Com base nas análises filogenética, genômica, fenotípica e fisiológica, propomos que a cepa Sp245^T, juntamente com as estirpes Vi22 e BR 12001, representam uma nova espécie do gênero *Azospirillum*, para o qual o nome *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. é proposto. O tipo de cepa é Sp245^T (= BR 11005^T = IBPPM 219T) (GCF_007827915.1, GCF_000237365.1 e GCF_003119195.2).

Palavras-chave: Genomic metrics. *Azospirillum*. Filogenia core- proteoma.

4.2 ABSTRACT

Azospirillum sp. strain Sp245^T, originally identified as belonging to *Azospirillum brasilense*, is recognized as a plant-growth-promoting rhizobacterium due to its ability to fix atmospheric nitrogen and to produce plant-beneficial compounds. *Azospirillum* sp. Sp245^T and other related strains were isolated from the root surfaces of different plants in Brazil. Cells are Gram-negative, curved or slightly curved rods, and motile with polar and lateral flagella. Their growth temperature varies between 20 °C to 38 °C and their carbon source utilization is similar to other *Azospirillum* species. A preliminary 16S rRNA sequence analysis showed that the new species is closely related to *A. brasilense* Sp7^T and *A. formosense* CC-Nfb-7^T. Housekeeping genes revealed that *Azospirillum* sp. Sp245^T, BR 12001 and Vi22 form a separate cluster from strain *A. formosense* CC-Nfb-7^T, and a group of strains closely related to *A. brasilense* Sp7^T. Overall genome relatedness index (OGRI) -analyses estimated based on average nucleotide identity (ANI) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH)- between *Azospirillum* sp. Sp245^T and its close relatives to other *Azospirillum* species type strains, such as *A. brasilense* Sp7^T and *A. formosense* CC-Nfb-7^T, revealed values lower than the limit of species circumscription. Moreover, core-proteome phylogeny including 1,079 common shared proteins showed the independent clusterization of *A. brasilense* Sp7^T, *A. formosense* CC-Nfb-7^T and *Azospirillum* sp. Sp245^T, a finding that was corroborated by the genome clustering of OGRI values and housekeeping phylogenies. The DNA G+C content of the cluster of Sp245^T was 68.4-68.6%. Based on the phylogenetic, genomic, phenotypic and physiologic analysis, we propose that strain Sp245^T together with the strains Vi22 and BR12001 represent a novel species of the genus *Azospirillum*, for which the name *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. is proposed. The type strain is Sp245^T (=BR 11005^T=IBPPM 219^T) (GCF_007827915.1, GCF_000237365.1, and GCF_003119195.2).

Keyword: Genomic metrics. *Azospirillum*. Proteoma- core phylogeny.

4.3 INTRODUCTION

The *Azospirillum* genus comprise free-living, Gram-negative bacteria that do not form spores. Bacteria from this genus are able to grow under microaerophilic conditions and their cells are rod or spiral-shaped. The genus was proposed from a reclassification of a group of strains of '*Spirillum lipoferum*', and first described as the species *A. brasilense* and *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978). In 2015, the genus *Azospirillum* was divided and two new genera were created, *Nitrospirillum*, to which *A. amazonense* was transferred, as well as *Niveispirillum*, which included *A. irakense* (LIN et al., 2014). Nowadays, a total of 21 species belonging to *Azospirillum* are recognized and validated (<http://www.bacterio.net/azospirillum.html>).

Since the description of the genus *Azospirillum*, different strains aroused the interest for their potential as plant- growth-promoters, notably because their association with cereals of economic importance (TARRAND et al., 2014; FUKAMI et al., 2016; FUKAMI et al., 2018). As a result of the research conducted firstly by Johanna Döbereiner in Brazil in the 1970s, two main abilities are highlighted: to fix atmospheric nitrogen (N) (DAY & DÖBEREINER, 1976) and produce plant-growth- regulators like auxins, cytokinins, and gibberellins (Reynders & VLASSAK, 1979; TIEN et al., 1979). Therefore, this genus has been one of the most studied plant growth-promoting-bacteria in the last decades and it has been used as inoculant for crops in several countries, reaching millions of hectares in South America alone (CASSÁN et al., 2020; FUKAMI et al., 2018; HUNGRIA et al., 2010).

Azospirillum brasilense is the most studied species of the genus and *Azospirillum* sp. Sp245^T can be considered a model strain due to the knowledge accumulated over it in more than 30 years (CASSÁN et al., 2020). This strain was isolated from surface- sterilized roots of wheat (*Triticum aestivum* L.), originary from Rio Grande do Sul State, Southern Brazil (BALDANI et al., 1983; BALDANI et al., 1986), and has been considered a promising wheat inoculant in Brazil since the 1980s (CASSÁN et al., 2016). In contrast to the rhizosphere soil isolate strain Sp7^T, strain Sp245^T is able to colonize wheat roots endophytically (SCHLOTTER & HARTMANN, 1998). Despite the phenotypic and physiologic similarities with the *A. brasilense* type strain Sp7^T, strain Sp245^T has been indicated as a distinct species, based on previous DNA analyses (MARONICHE et al., 2017).

These authors pointed out that the Average Nucleotide Identity (ANI) between the strains Sp245^T and Sp7^T is less than 95-96%, the threshold for the species delimitation. In the same way, spectrophotometric DNA-DNA-analyses demonstrated only 54% DNA-DNA-hybridization between the strains Sp7^T and Sp245^T, which again indicated the necessity for a separate species (HARTMANN et al., 2019). In addition, based on spectrometry protein profiling obtained through MALDI-TOF MS analysis it was shown that *A. brasilense* Sp7^T and Sp245^T formed distinct branches (STETS et al., 2013).

Here we present a phylogenomic study based on *Azospirillum* spp. strains collected in different places around the world. Besides Sp245^T and Sp7^T, other type strains were included with the aim to clarify the taxonomy position of strain Sp245^T. The results led us to propose the new species *A. baldaniorum*, which is described here.

4.4 MATERIAL AND METHODS

4.4.1 Strain collection

The study included ten *Azospirillum* spp. isolated from roots, rhizosphere soil or bulk soil in different countries and hosts (Table 2) and *A. formosense* CC-Nfb-7^T from agricultural soil in China (LIN et al., 2012). All isolates, excepting Vi22, MTCC4038, and SR80 are deposited in the collection of Biological Resource Centre Johanna Döbereiner (WDC364), Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro-Brazil (www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd). Sp245^T is also deposited in the Bacterial Culture Collection at the Microbiology and Agricultural Zoology (WDCM31), Institute INTA-IMYZA, Castelar, Buenos Aires, Argentina, and in the Collection of Rhizosphere Microorganisms of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms (WDCM1021), Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Prospekt Entuziastov, Saratov, Russia (<http://collection.ibppm.ru/>).

4.4.2 16S rRNA and housekeeping genes phylogenetic reconstruction

The genomic DNA was extracted using the Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Wizard; Promega) with a few modifications (LEITE et al., 2018). The 16S rRNA gene was PCR- amplified using common universal primers (27F/1492R) and sequenced by Sanger's dideoxy DNA sequencing method. The type strain 16S rRNA sequences were retrieved from NCBI nucleotide database (www.ncbi.nlm.nih.gov). The sequences were aligned with Muscle in mega X (KUMAR et al., 2018). Concatenation of housekeeping genes was performed by Seaview (GALTIER et al., 1996). The evolutionary distance was calculated using Jukes-Cantor model that was the best fit model. The Maximum-Likelihood (ML) trees were reconstructed using Mega 10.0.

4.4.3 Genome analyses

The genome of *A. brasilense* Sp7^T (four genomes available), *Azospirillum* sp. Sp245^T (three genomes available), and other *Azospirillum* spp. type strains were retrieved from the NCBI Assembly database (Table 3). *A. formosense* CC-Nfb-7^T, *A. melinis* TMCY0552^T, and strains BR 11017, BR 11019, BR 11649 were sequenced in this work. Total DNA was extracted as described by previous work (AMBROSINI et al., 2012). Libraries were constructed using Nextera XT kit and sequenced with MiSeq Reagent Kit V3 (2×300 bp) in an Illumina Miseq platform.

The genome of strain Sp245^T (BR 11005), despite being available, was re-sequenced in order to check if we had in our collection exactly the same strain as the first sequenced strain. This strain together with BR 12001 and BR 11002 were sequenced at the DOE-Joint Genome Institute (JGI) as part of the Genomic Encyclopaedia of Type Strains, Phase IV (KMG-V): Genome sequencing to study the core and pangenomes of soil and plant-associated prokaryotes (<https://gold.jgi.doe.gov/studies?id=G0129091>), using the Illumina NovaSeq 6000 platform. Draft genomes for the new strains were assembled using SPAdes version 3.13 (k-mer values equal to 21, 33, 55, 77, 99, 127) (BANKEVICH et al., 2012), and they were annotated using the NCBI Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline (PGAAP), which combines Hidden Markov Model (HMM)-based gene prediction methods with homology- based methods (ANGIUOLI et al., 2008). The quality of assemblies was evaluated with Blobtools 1.1.1 (Laetsch et al., 2017) Quast v. 2.3 (GUREVICH et al., 2013) and Checkm v.0.9.6 (PARKS et al., 2015). The genome features are presented in the Table 4.

ANI values based on blast and Mummer alignments from all pairwise genome comparisons were calculated using Pyani version 0.2.7, a python module for calculating genomic metrics (<https://github.com/widdowquinn/pyani>) (PRITCHARD et al., 2016), gANI (ANI based on whole genome), and AF (alignment fraction) based on the Microbial Species Identifier (MiSI) method (VARGHESE et al., 2015). Digital DNA–DNA hybridization (dDDH) was estimated using GGDC (Genome Distance Calculator for Genome; <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) and OrthoANI were calculated using OAT version 1.30 (www.ezbiocloud.net/tools/orthoani) (LEE et al., 2016)

Ortholog protein groups were defined using bidirectional best hits algorithm implemented in Get_homologues build 20170609 following (SAN'ANNA et al., 2017). Briefly, the core-proteome was compiled using minimum blast searches and clusters with inparalogs were excluded. Each of the single-copy proteins was aligned with MUScle using default parameters and the alignments were concatenated with MegaX (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29722887/>). Subsequently, the phylogenetic tree of the core-proteome was reconstructed using Neighbour-Joining approach with Jones-Taylor-Thornton substitution model, deleting positions containing gaps.

We employed a clustering method using the genomic relatedness values to better visualize the groups of strains. Procedures with the same goal were described before (VARGHESE et al., 2015; VALLENET et al., 2009). Here, the genomes were grouped according to a connection criterion of $\geq 95\%$ of identity with $\geq 70\%$ of alignment coverage for ANIb, ANIm and OrthoANI analysis; and $\geq 96.5\%$ of gANI with ≥ 0.6 of AF. We use an approach similar to the procedure of community detection from the network science. For ANIm and ANIb approaches that generate an output of a two way calculation, we generate a triangular form of the coverage and identity matrices considering the higher value and the mean value from the two way calculation, respectively. Then, for all different ANI methods, identity and coverage/AF matrices had their values above the respective connecting criterion replaced by 1, otherwise they were replaced by 0.

The two matrices generated for each method were then multiplied and the distances were obtained. Nodes were connected using the `graph_from_adjacency_matrix` function from `igraph` R package (CSARDI & NEPUSZ, 2006) and visualized with `forceNetwork` function from `networkD3` R package (Allaire et al., 2017). The formed groups have nodes corresponding to genomes and edges corresponding to ANI values above the cutoff for species delineation with a coverage or AF value reflecting a reliable alignment between the set of genomes. A detailed tutorial for the clustering steps on R can be found at https://osf.io/h25wv/wiki/home/?view_only=58afccd2aa004d19884c5102c8b92e95

4.4.4 Phenotype and physiology of new species

We additionally investigated some carbon source utilization of the strains Sp245^T and BR 12001 (both new species), Sp7^T (*A. brasiliense*) and CC-NFb-7^T (*A. formosense*), as well as the enzyme activity using Biolog GN II and API 20NE test kit following method previously described (MICHEL et al., 2017). We also tested the resistance to antibiotic, using impregnated discs (Oxoid). For that, the strains were grown on Dyg's liquid médium (Rodrigues Neto et al., 1986), and after 24 h the cultures (100 μ l) were inoculated over solid Dyg's medium in Petri dishes, and the antibiotic discs were laid on the agar in three repetitions.

Table 2. Information of the strains used in the study.

Strain designation		host	Isolation source	Year of collection (estimated)	Country	Reference.
Original	Other					
Sp245 ^T	BR 11005 ^T , IBPPM 219 ^T	wheat (<i>Triticum aestivum</i>)	Surface disinfected roots	1980	Brazil	(BALDANI et al., 1983)
AzB 60	BR 12001	signal grass (<i>Brachiaria decumbens</i>)	Surface disinfected roots	1999	Brazil	unpublished
Vi22	Vi22	sunflower (<i>Helianthus annuus</i>)	Roots	2012	Brazil	(AMBROSINI et al., 2012)
Sp7 ^T	BR 11001 ^T , ATCC 29145 ^T , DSM 1690 ^T , LMG 13127 ^T	digit grass (<i>Digitaria decumbens</i>)	Rhizosphere	1974	Brazil	(TARRAND et al., 1978)
R3	BR 11017	sorghum (<i>Sorghum vulgaris</i>)	Roots	1987	Russia	unpublished
R6	BR 11019	cat grass (<i>Dactylis glomerata</i>)	Roots	1987	Russia	unpublished
Sp42	BR 11649	maize (<i>Zea mays</i>)	Roots	1974	Brazil	unpublished
Sp Cd	BR 11002, ATCC 29710	bermuda grass (<i>Cynodon dactylon</i>)	rhizosphere soil	1976	USA	(TARRAND et al., 1978)
MTCC4038	-	-	agricultural field soil	2006	India	unpublished
SR80	-	Wheat (<i>Triticum aestivum</i>)	Seedlings	1988	Russia	unpublished

Table 3. Characteristics of the studied genomes.

Species	Strain	Genbank (Ac. number)	RefSeq assembly accession	Genome Size (Mbp)	Contigs	Protein	GC (mol%)	Coverage	Reference
<i>A. baldaniorum</i>	Sp245 ^T	NZ_CP022253	GCF_003119195.2	7,68239	7	6,703	68,4	145.0	unpublished
	BR 12001	NZ_VITE01000000	GCF_007827765.1	7,3645	61	6,536	68,6	204.0	this study
	Vi22	VSRJ00000000	GCF_013341015.1	7,440708	301	6,642	68,5	57	this study
	Sp7 ^T	NZ_CP033312	GCF_008274945.1	7,10024	6	6,270	68,4	100.0	unpublished
<i>A. brasiliense</i>	BR 11017	WFKA00000000	GCF_013340975.1	7,29369	314	6,506	68,2	67	this study
	BR 11019	WFKB00000000	GCF_013340985.1	7,073989	1640	6,384	68,5	15	this study
	BR 11649	WFKD00000000	GCF_013340915.1	7,287852	512	6,554	68,2	23	this study
	BR 11002	NZ_VITX01000000	GCF_007828115.1	6,96097	42	6,184	68,4	215.0	unpublished
	MTCC4038	NZ_CP032339	GCF_005222145.1	7,13417	6	6,214	68,3	100.0	unpublished
	SR80	NZ_QXHE01000000	GCF_003584185.1	7,14659	231	6,318	68,3	59.0	unpublished
<i>A. formosense</i>	CC-Nfb-7 ^T	WHOR00000000	GCF_013340925.1	6,161078	569	5,702	68,6	17	this study
<i>A. melinis</i>	TMCY0552 ^T	WHOS00000000	GCF_013340935.1	7,970174	160	6,920	67,7	107	this study
<i>A. lipoferum</i>	59b ^T	NZ_VTTN01000000	GCF_008364955.1	7,98718	77	6,880	67,3	127.0	unpublished
<i>A. halopraeferens</i>	DSM 3675 ^T	NZ_AUCF01000000	GCF_000429625.1	6,512380	56	5,872	70,7	unknown	unpublished
<i>A. doebereineriae</i>	GSF71 ^T	NZ_RZIJ01000000	GCF_003989665.1	7,00006	115	6,000	68,9	250.0	unpublished
<i>A. oryzae</i>	COC8 ^T	NZ_VTTM01000000	GCF_008364795.1	6,7552	42	5,852	67,4	154.0	unpublished
<i>A. thiophilum</i>	DSM 21654 ^T	NZ_LAEL01000000	GCF_000960825.1	7,63752	11	6,516	68,2	108.39	(LAVRINENKO et al., 2010)
<i>A. palustre</i>	B2 ^T	NZ_PDKW01000000	GCF_002573965.1	7,99749	99	6,887	67,8	30.0	(TIKHONOVA et al., 2019)
<i>A. humicireducens</i>	SgZ-5 ^T	NZ_CP015285	GCF_001639105.2	6,8627	29	5,853	67,4	259.0	(ZHOU et al., 2013)
<i>Rhodospirillum centenum</i>	ATCC51521 ^T	NC_011420	GCF_000016185.1	4,35554	1	3,847	70.5	unknown	(LU et al., 2010)

4.5 RESULTS AND DISCUSSION

4.5.1 16S rRNA and housekeeping genes phylogenetic reconstruction

A blast search in NCBI (Standard nucleotide database) showed that the strains Sp245^T, BR 12001, Vi22, BR 11017, BR 11019, BR 11649, BR 11002, beside MTCC4038 and SR80, present high 16S rRNA similarity with some *Azospirillum* type strains, particularly Sp7^T and CC-Nfb-7^T. Thereafter the ML reconstruction with approximately 1200 nucleotides comparing these strains with all *Azospirillum* type strains revealed that they clustered together with *A. brasilense* and *A. formosense* CC-Nfb-7^T (Figure. 3).

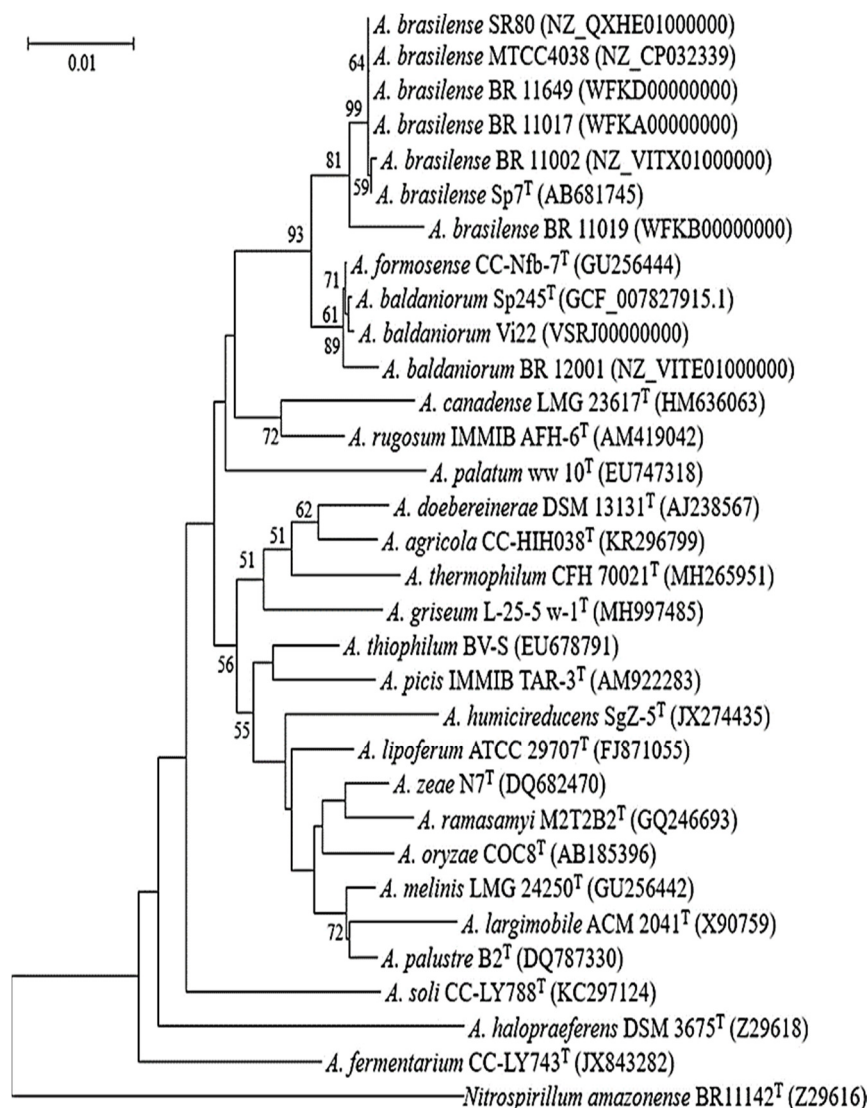


Figure. 3. Maximum-Likelihood (using Jukes-Cantor substitution model) phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between the new strains and the type species (T) of the genus *Azospirillum*. Bootstrap values were inferred from 500 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. GenBank accession numbers are provided in parenthesis. *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T was included as the outgroup. The bar represents one substitution per 100 nucleotide positions.

The strains Sp245^T, BR 12001, and Vi22 grouped together with *A. formosense* CC-Nfb7^T, while BR 11017, BR 11019, BR 11649, BR 11002, MTCC4038, and SR80 were close to *A. brasilense* Sp7^T. Considering the low resolution of the 16S rRNA gene for identifying *Azospirillum* spp., we also performed a housekeeping gene analyses using the sequences of the genes *atpD*, *glnII*, *recA* and *rpoD*, focusing on the strains *A. formosense* CC-Nfb- 7^T and *A. brasilense* Sp7^T, the closest strains to *Azospirillum* sp. Sp245^T. Individual or concatenated reconstructions using these genes (Figure 4 and 5), available in the online version of this article) returned three main clusters, joining the strains Sp245^T, BR 12001, and Vi22 together in one cluster with over 99% similarity; CC-Nfb-7^T was separated from the others with less than 98.7% of DNA sequence similarity; and one group with the strains BR 11017, BR 11019, BR 11649, BR 11002, MTCC4038, and SR80 together with Sp7^T, varying in similarity among them from 98.9–100%. Therefore, taking in account the 16S rRNA and housekeeping gene analyses we have an indication that Sp245^T, together with BR 12001 and Vi22, represents a species different from *A. brasilense* Sp7^T and *A. formosense* CC-Nfb-7^T, as it was firstly observed elsewhere (MARONICHE et al., 2017).

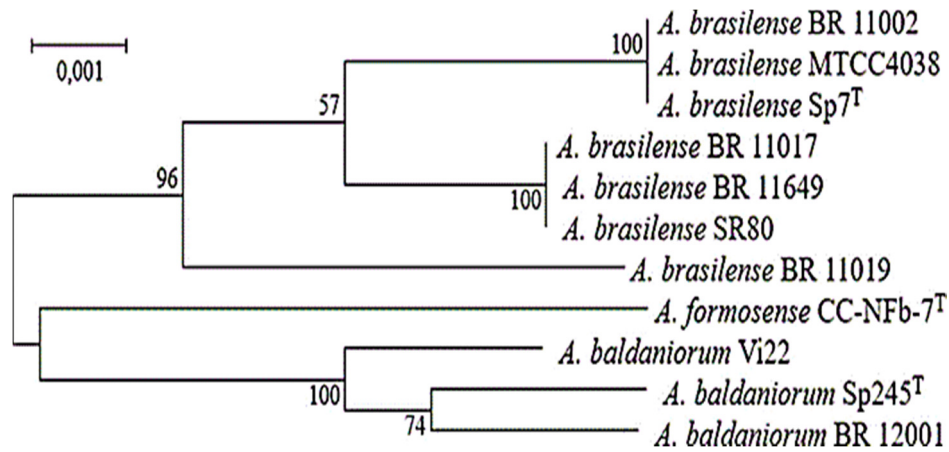


Figure. 4. Unrooted Maximum-Likelihood (using Jukes-Cantor methods) phylogenetic tree based on four concatenated sequences (*atpD*, *glnII*, *recA* and *rpoD*) showing relationships between Sp245^T-cluster, Sp7^T-cluster and CC-Nfb-7^T. The sequences of the genes were extracted from the genome listed in Table 4. Bootstrap values were inferred from 500 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. The bar represents one estimated substitution per 100 nucleotide positions.

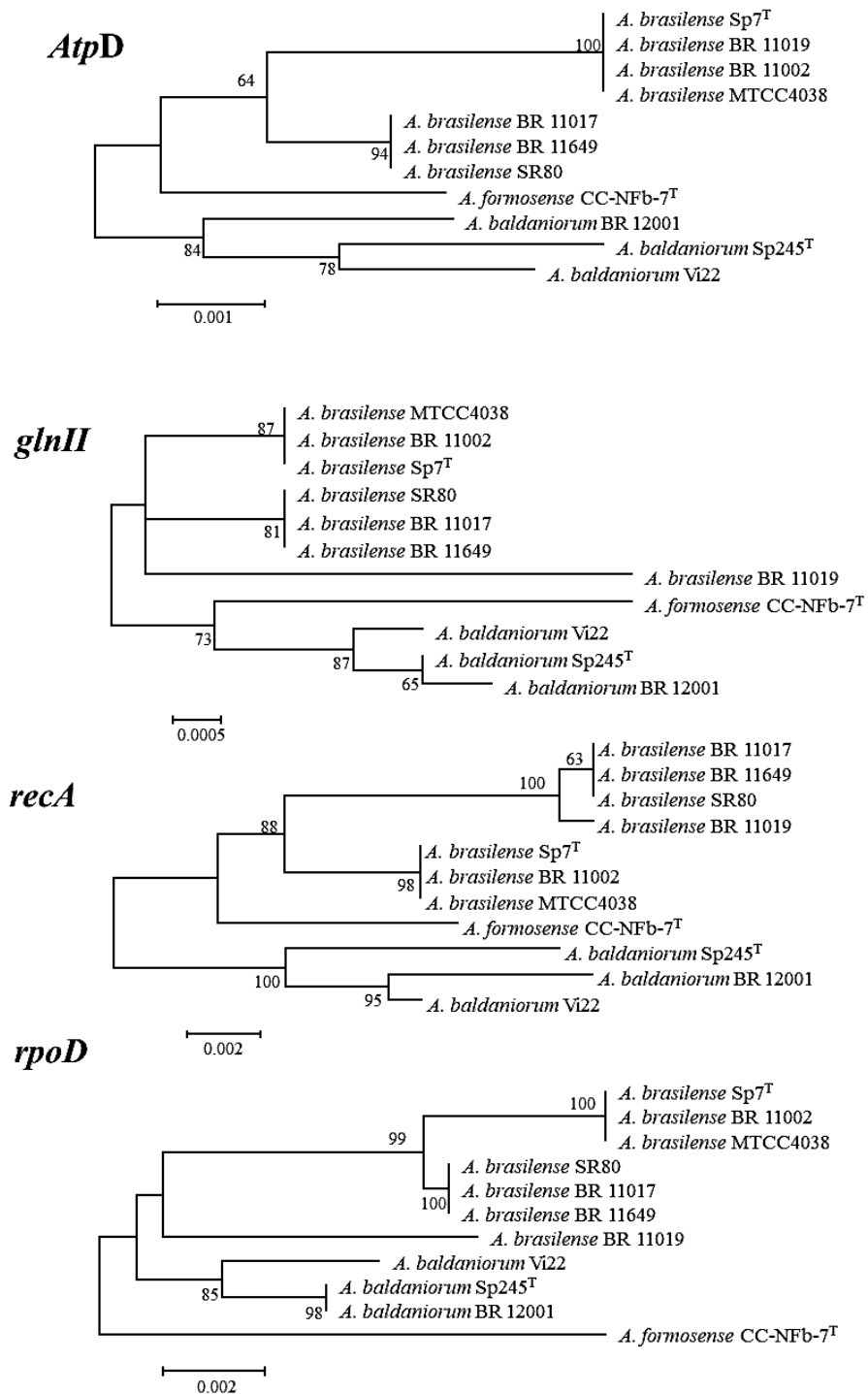


Figure 5. Unrooted maximum likelihood (using Jukes-Cantor methods) phylogenetic tree based on sequences gen *atpD*, *glnII*, *recA* and *rpoD* showing relationships between Sp245^T-cluster, Sp7^T-cluster and CC-Nfb-7^T. Bootstrap values were inferred from 500 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. The bar represents the estimated substitution per 100 nucleotide positions.

4.5.2 Genome analyses

The G+C% content of the strains Sp245^T, BR 12001 and Vi22 varied from 68.4 to 68.6 (Table 2). These values are similar to *A. brasilense* Sp7^T and *A. formosense* CC-Nfb-7^T. ANI (ANIm, ANIb, OrthoANI, gANI) or dDDH were first estimated for the new genome that was sequenced for strain Sp245^T (assembly GCF_007827915.1) with the two already deposited in NCBI (assembly GCF_000237365.1 and GCF_003119195.2). We observed all values close to 100% confirming that the different assemblies came from the same strain. Therefore, in the subsequent analyses, we used GCF_003119195.2, because it was the most finalised assembly. Similarly, we compared different assemblies available for Sp7^T and we verified that they also came from the same strain, since the genomes available (GCF_008274945.1, GCF_001315015.1, GCF_007827425.1, GCA_002027385.1) were close to 100% in ANI values.

All ANI calculations returned values above 98.54 and 98.79 %, respectively, between strains inside the Sp245^T- cluster (i.e. Sp245^T, BR 12001 and Vi22) and 98.18% a 99.98 % for the Sp7^T-cluster (i.e. Sp7^T, BR 11017, BR 11019, BR 11649, BR 11002, MTCC4038 and SR80) (Table 3). Moreover, dDDH calculations showed values above 81.0 inside each cluster, proving the strains in each cluster represented the same species (Table 4). Thereafter, we compared strain Sp245^T with strains from the Sp7^T-cluster and vice versa, and both strains Sp245^T and Sp7^T against CC-Nfb-7^T (Table 4). OGRI estimate with ANIm, ANIb, OrthoANI between Sp245^T and Sp7^T-cluster or with CC-Nfb-7^T were less than 94.60; similarly, Sp7^T against Sp245^T-cluster or CC-Nfb-7^T were less than 94.76 (Table 4). Calculations with gANI proved to be more conservative, showing values slightly above 95.0 in all comparison (Table 4). dDDH estimation were always below 60.0 when we compared Sp245^T with the Sp7^T-cluster or vice versa and both Sp245^T and Sp7^T with CC-Nfb-7^T (Table 4).

Complete genome comparison has been shown to be reproducible, reliable and informative to infer phylogenetic relationships among prokaryotes to replace the classical wet-lab-methods, like DNA hybridization, leading to a taxonomy subcommittee to establish the genome publication as a mandatory for species description (DE LAJUDIE et al., 2019). Different ANI calculation methods based on pairwise genome analysis have been proposed, such as ANIm, ANIb, OrthoANI, and gANI, or even other metrics to compare genomes, like dDDH. Details regarding ANI methods and requirement of gDNA for the calculation were recently published (CHUN et al., 2018; PALMER et al., 2020). ANI value of 95-96% and dDDH 70% have been recommended as threshold as these values correlate well with 70% similarity estimated by classical DNA-DNA method and with 5 °C melting temperature differences based on denaturation method (PALMER et al., 2020; KONSTANTINIDIS & TIEDJE et al., 2007).

Considering that the ANI values between different *Azospirillum* species are around the grey zone (94-96%), in order to have more confidence on the species groups, we established an ANIb value of 96% as species circumscription limit. In a recently published paper, it was concluded that more than one ANI method must be used to establish the cut-off, not only use 95–96% arbitrarily (PALMER et al., 2020). Therefore, based on different methods applied we have the confirmation that the strain Sp245^T, together BR 12001 and Vi22, represents a new species of the *Azospirillum* genus with *A. brasilense* Sp7^T and *A. formosense* CC-Nfb-7^T as the closest neighbours.

Table 4. Genomic metrics of *A. baldaniorum* (Sp245^T), *A. brasilense* (Sp7^T) and CC-Nfb-7^T with related strains.

Strain	Sp245 ^T					Sp7 ^T				
	ANIm (%)	ANIb (%)	OrthoANI (%)	gANI (%)	dDDH (mol%)	ANIm (%)	ANIb (%)	OrthoANI (%)	gANI (%)	dDDH (mol%)
BR 12001	98.63	98.55	98.63	98.76	87.50	94.58	94.22	94.55	95.2	56.80
VI22	98.65	98.54	98.65	98.79	87.80	94.60	94.23	94.48	95.2	57.00
BR 11017	94.59	94.25	94.43	95.12	56.70	98.62	98.44	98.61	98.73	87.10
BR 11019	94.40	93.73	94.26	94.26	54.80	98.18	97.68	98.25	98.39	81.50
BR 11649	94.59	94.23	94.39	95.13	56.70	98.60	98.35	98.59	98.72	87.20
BR 11002	94.61	94.35	94.60	95.17	57.00	99.98	99.90	99.97	99.98	99.60
MTCC4038	94.62	94.38	94.50	95.16	57.10	99.97	99.85	99.96	99.98	99.50
SR80	94.59	94.32	94.45	95.11	56.70	98.62	98.47	98.61	98.74	87.50
CC-Nfb-7 ^T	94.45	94.17	94.44	95.12	56.00	94.76	94.52	94.69	95.40	57.70
TMCY0552 ^T	85.45	79.63	79.20	80.94	23.80	85.29	79.30	79.04	80.68	23.30
59b ^T	85.41	79.38	79.00	80.79	23.40	85.33	79.20	78.82	80.53	23.20
DSM 3675 ^T	84.29	77.94	77.09	81.67	21.80	84.26	77.87	77.05	81.23	21.60
GSF71 ^T	85.52	80.29	79.92	81.61	23.60	85.45	80.12	79.79	81.48	23.40
COC8 ^T	85.40	79.73	79.30	80.98	23.40	85.27	79.52	79.14	80.77	23.20
DSM 21654 ^T	85.35	79.62	79.26	80.88	23.50	85.32	79.57	79.27	80.92	23.40
B2 ^T	85.51	79.67	79.46	81.16	23.80	85.41	79.39	70.14	80.91	23.60
SgZ-5 ^T	85.43	79.58	79.22	80.98	23.40	85.38	79.45	79.08	80.78	23.20

Bold, values within the species circumscription limits. Species circumscription thresholds, ANIm, ANIb and OrthoANI and gANI (96%), dDDH (70 %). Access number of reference strain deposited in NCBI genome database database: Sp245^T (GCF_003119195.2), Sp7^T (GCF_008274945.1) and CC-Nfb-7^T (GCF_013340925.1).

In order to get a better resolution of the genome analysis we also used the core-proteome analysis to infer the phylogenetic position of the new species. The size of the proteomes utilized in this analysis varied between 3847 to 6920 proteins (median 6351). The core-proteome was composed of 1079 proteins, and the concatenated alignment contained 338791 positions. The phylogenetic reconstruction of the core-proteome demonstrated that the strains Sp245^T, Vi22, and BR 12001 form a distinct group, separate from the *A. brasilense* Sp7^T- cluster and the strain *A. formosense* CC-NFb-7^T (Figure 6).

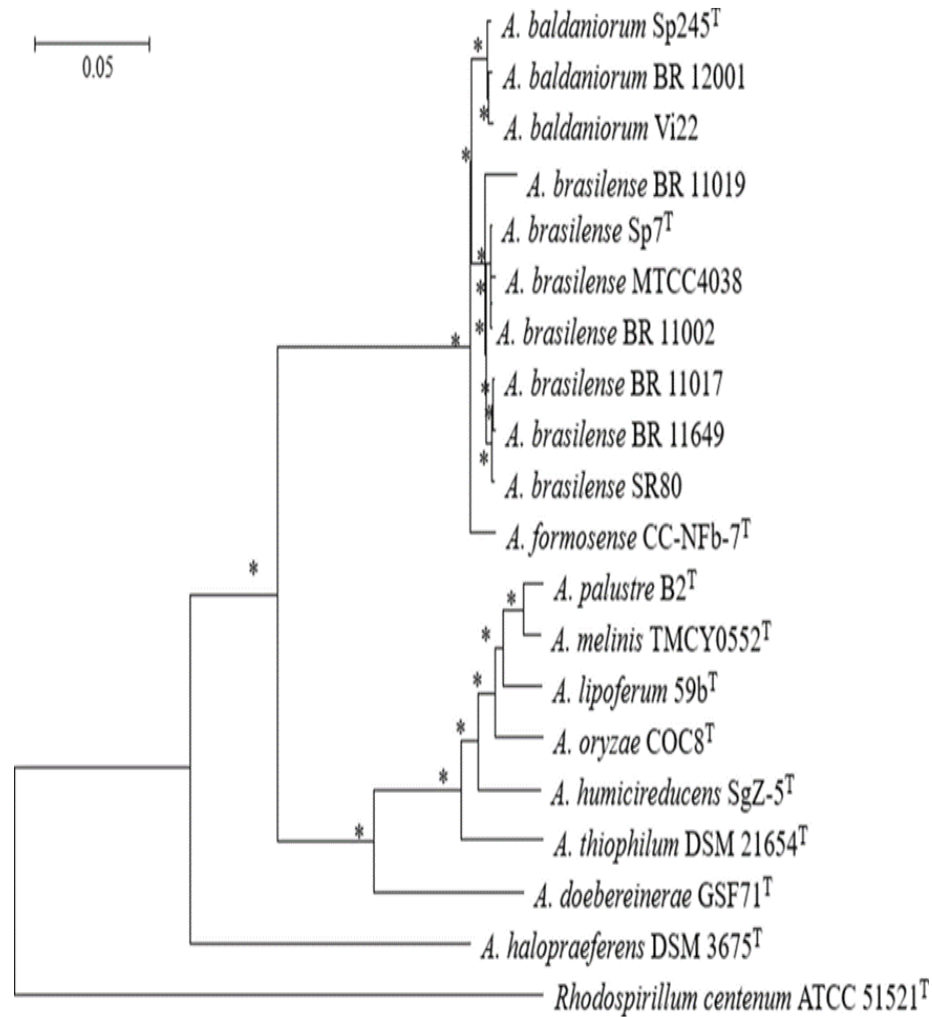


Figure 6. Core-proteome phylogeny of *Azospirillum* species. The core-proteome rooted tree was constructed using the Neighbour-Joining method. *Bootstrap values 100%. Bar indicates the number of nucleotide substitution.

Finally, the genome clustering analysis corroborated the findings of the phylogenetic reconstruction of the core-proteome and housekeeping phylogeny, i.e. strain Sp245^T was grouped together to BR 12001 and Vi22, while *A. brasilense* Sp7^T was grouped with BR 11017, BR 11019, BR 11649, BR 11002, MTCC4038, and SR80 (Fig. 4). *A. formosense* CC-NFb-7^T did not cluster with any of the genome clusters where the groups Sp245^T and Sp7^T were located (Figure 7).

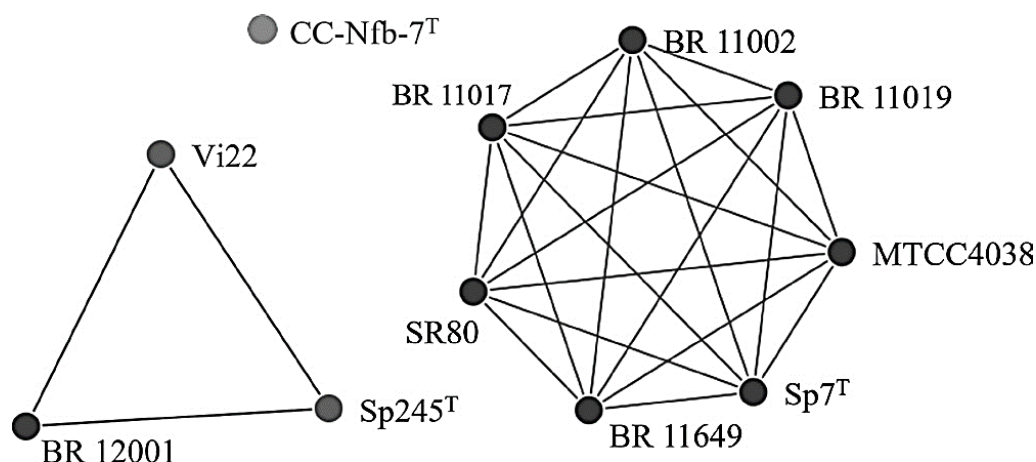


Figure 7. Genome clustering analysis of the ANIb values. Species clusters were defined according to a linkage criterion of $\geq 95\%$ of ANIb with $\geq 70\%$ of alignment coverage.

4.5.3 Phenotype and physiology of new species

Strain Sp245^T is one of the most studied plant-growth-promoting bacteria worldwide, especially considering its potential as plant inoculant (CÁSSAN & DIAZ ZORITA, 2016). The knowledge accumulated over the years lead this strain to be considered a model for studies on plant-bacteria interactions (DAY & DÖBEREINER, 1976; STEENHOUDT et al., 2000; CÁSSAN et al., 2014). Cells of strains Sp245^T are Gram-negative, slightly curved rods, spiral, 1.6–2.1 μm long and 0.5–0.7 μm wide. Motile with long polar flagellum and several lateral ones shorter in length (KOVTONOV et al., 2013; BALDANI et al., 2014). The strain Sp245^T is able to grow between 20 and 38 °C with an optimum temperature around 30 °C depending of the culture médium (ONA et al., 2005). As for *A. brasilense* Sp7^T, the closest species, it has been demonstrated that Sp245^T is a nitrogen-fixing bacterium, and produces high number of plant-growth-regulators, such as IAA and nitric oxide (CÁSSAN et al., 2020; AMBROSINI et al., 2012; STEENHOUDT et al., 2000; Cássan et al., 2014; CREUS et al., 2005). Sp245^T is able to denitrify and possess the entire pathway for the denitrification process, i.e. *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes (CREUS et al., 2005; ZILLI et al., 2019).

The strains Sp245^T and BR 12001 were able to grow using the same carbon source, but not α -keto valeric acid and D-serine (Table 5). In general, these strains present more ability to growth in the carbon source in Biolog GNII kit than the closest strains Sp7^T and CC-NFb-7^T (Tables 6 and Table 7). Sp245^T and BR 12001 differentiate from CC-NFb-7^T in the usage of five C-source and from Sp7^T in the usage of 15 different sources; l-rhamnose was only used by the strains Sp245^T and BR 12001 (Tables 4 and S1). All the four strains tested presented sensitivity to gentamicin (10 μg per disc), kanamycin (30), rifampicin (30), streptomycin (25) and tetracycline (30), and only BR 12001 was resistance/ tolerant to chloramphenicol (30) and erythromycin (15). Enzymatic tests using API 20NE showed that Sp7^T and CC-NFb-7^T, as well as Sp245^T and BR 12001 are able to reduce nitrate and nitrite; urease is negative in Sp245^T, BR 12001 and CC-NFb-7^T, but active in Sp7^T.

Table 5. Differential characteristics of strains *A. baldaniorum* (Sp245^T and BR 12001) and related species of the genus *Azospirillum*: *A. brasilense* (Sp7^T) and strain *A. formosense* (CC-NFb-7^T).

Characteristics	Strains			
	Sp7 ^T	CC-NFb-7 ^T	BR 12001	Sp245 ^T
L-Arabinose	+	+	+	+
D-Arabitol	-	+	+	+
D-Fructose	-	+	+	+
L-Fucose	-	+	+	+
D-Galactose	-	+	+	+
Gentioniose	-	+	+	+
α -D-Glucose	-	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
D-melibiose	-	+	+	+
D-Picose	-	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	+	+
Formic Acid	-	+	+	+
D-Galactonic Acid Lactone	-	+	+	+
D-Galacturonic Acid	-	+	+	+
D-Glucosaminic Acid	+	-	+	+
α -keto Butyric	+	-	+	+
α -Keto Valeric	-	-	-	+
Glucuronamide	-	+	+	+
D-Serine	+	-	-	+
Thymidine	+	-	+	+
Phenyethylamine	+	-	+	+
Glucose- 6- Phosphate	-	+	+	+
Nitrate and nitrite reduction	+	+	+	+
Indol production	-	+	+	+
Urease	+	-	-	-
Protease	+	-	+	-

All phenotypic characteristics were determined in this study. +, Positive; – Negative.

Table 6. Biochemical features of *A. baldaniourum* strains and related species.

Carbon source	Strain			
	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> BR 12001	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T
α -Cyclodextrin	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+
Glycogen	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+
N-Acety-D-galactosamine	+	+	+	+
N- Acety-D-Glucosamine	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+
I-Erythritol	+	+	+	+
M-Inositol	+	+	+	+
α -D-Lactose	+	+	+	+
Lactulose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
β -Methyl-D-Glucoside	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+
Turanose	+	+	+	+
Xylitol	+	+	+	+

To continued...

Continuation of **Table 6.**

Carbon source	Strain			
	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> BR 12001	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T
Methyl Pyruvate	+	+	+	+
Mono-Methyl Succinate	+	+	+	+
Acetic Acid	+	+	+	+
Cis Aconotic Acid	+	+	+	+
Citric Acid	+	+	+	+
D-Gluconic	+	+	+	+
D-Glucuronic Acid	+	+	+	+
α -Hydroxy Butyric Acid	+	+	+	+
β -Hydroxy Butyric Acid	+	+	+	+
γ -Hydroxy Butyric Acid	+	+	+	+
P-hydroxy phenylacetic Acid	+	+	+	+
Itaconic Acid	+	+	+	+
α -Keto Glutaric	+	+	+	+
D,L-Lactic Acid	+	+	+	+
Malonic Acid	+	+	+	+
Propionic Acid	+	+	+	+
Quinic Acid	+	+	+	+
D-Saccharic Acid	+	+	+	+
Sebacic Acid	+	+	+	+
Succinic Acid	+	+	+	+
Bromo Succinin Acid	+	+	+	+

To be continued...

Continuation of **Table 6.**

Carbon source	Strain			
	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> BR 12001	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T
Succinamic Acid	+	+	+	+
L-Alaninamide	+	+	+	+
D-Alanine	+	+	+	+
L-Alanine	+	+	+	+
L-Alanyl-glycine	+	+	+	+
L-Asparagine	+	+	+	+
L-Aspartic Acid	+	+	+	+
L-Glutamic Acid	+	+	+	+
Glycyl-L-Aspartic Acid	+	+	+	+
Glycyl-L-Glutamic Acid	+	+	+	+
L-Histidine	+	+	+	+
Hydroxy-L- Proline	+	+	+	+
L-Leucine	+	+	+	+
L-Ornithine	+	+	+	+
L-Phenylalanine	+	+	+	+
L-Proline	+	+	+	+
L-Pyroglutamic Acid	+	+	+	+
L-Serine	+	+	+	+
L-Threonine	+	+	+	+
D,L-Carnitine	+	+	+	+
λ-Amino Butyric Acid	+	+	+	+

To be continued...

Continuation of **Table 6.**

Carbon source	Strain			
	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> BR 12001	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T
Urocanic Acid	+	+	+	+
Isonine	+	+	+	+
Uridine	+	+	+	+
Putrescine	+	+	+	+
2-Aminoethanol	+	+	+	+
2,3- Butanediol	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+
D,L- α -Glycerol Phosphate	+	+	+	+
Glucose-1-Phosphate	+	+	+	+
Fermentation (Glucose)	-	-	-	-
Arginine Dihydrolase	-	-	-	-
Hydrolysis (β -glucosidase) (esculin)	+	+	+	+
β -galactosidase (Para-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)	+	+	+	+
Assimilation (glucose)	+	+	+	+
Assimilation (N-acetyl-glucosamine)	+	+	+	+
Assimilation (maltose)	+	+	+	+
Assimilation (Acid adipate)	+	+	+	+
Assimilation (Acid malate)	+	+	+	+
Assimilation (trisodium citrate)	-	-	-	-
Assimilation (Acid fenil-acetate)	-	-	-	-

-, no reaction; +, positive reaction.

4.6 CONCLUSION

Description of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov.: *Azospirillum baldaniorum* (bal.da.ni.o'rum. N. L. gen. pl. n. baldaniorum of the Baldanis's, named in honour of Dr. José Ivo Baldani and Dr. Vera Divan Baldani, Brazilian microbiologists, for their pioneering contributions to *Azospirillum* research. Cells are slightly curved rods, spiral, 1.6-2.1 μm long and 0.5-0.7 μm wide. Motile with long polar flagellum and several lateral ones shorter in length. Positive for nitrogen fixation in the environment and cells can grow on nitrogen-free medium. Grows at 20 and 38 °C with a maximum around 30 °C depending on the culture medium.

With Biolog GNII, the strains grown in a variety of carbon source, differentiating from the closest related strain Sp7^T by using: D-arabitol, D-fructose, l-fucose, D-galactose, gentiobiose, α -D-glucose, melibiose, D-picose, l-rhamnose, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, α -keto valeric, glucuronamide, glucose-6-phosphate; and from CC-NFb-7^T by using l-rhamnose, D-glucosaminic acid, α -keto butyric, α -keto valeric, D-serine, thymidine, and phenylethylamine. With API 20NE, the strains were clearly positive to nitrate and nitrite reduction, indole production, β -glucosidase, β -galactosidase, but not to urease and protease. The average nucleotide identity between strains of the new species is above 98.6%. The type strain is Sp245^T (=BR 11005^T=IBPPM 219^T), a diazotrophic plant growth-promoting bacterium isolated from surface- disinfected wheat roots in Brazil. The DNA G+C content of the type strain based on genome is 68.4 %.

4.7 REFERENCES

- ALLAIRE, J. J.; ELLIS, P.; GANDRUD, C.; KUO, K.; LEWIS, B. W. **Package network D3**; D3 JavaScript Network Graphs from R. 2017; R (>= 3.0.0). 2017.
- AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; STEFANSKI, T.; PINHEIRO, F. G.; VARGAS, L. K.; PASSAGLIA, L. M. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Soil** 356 (1-2):245-264. 2012.
- ANGIUOLI, S. V.; GUSSMAN, A.; KLIMKE, W.; COCHRANE, G.; FIELD, D.; GARRITY, G. Toward an online repository of standard operating procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. **OMICS** 12(2):137-141. 2008.
- BALDANI, J. I.; VIDEIRA, S. S.; TEIXEIRA, K. R.; REIS, V. M. The Family *Rhodospirillaceae*. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. pp. 533-618.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Can J Microbiol** 29(8):924-929. 1983.
- BALDANI, V. L. D.; DE, B.; ALVAREZ, M. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Establishment of Inoculated *Azospirillum* spp. in the Rhizosphere and in Roots of Field Grown Wheat and Sorghum. **Plant Soil** 35-46. 1986,
- BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J. Comput Biol** 19(5):455-477. 2012.
- ASSÁN, F.; □ONIGLIO, A.; LÓ□EZ, G. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biol Fertil Soils**; 2020.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biol Biochem** 03:117-130. 2016.
- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. **J Plant Growth Regul** 33(2):440-459. 2014.
- CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; DA COSTA, M. S. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **Int J Syst Evol Microbiol** 68:461-466. 2016.
- REUS, □. M.; GRAZIANO, M.; □ASANOVAS, E. M.; □EREYRA, M. A. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta** 221(2):297-303. 2005.
- CSARDI, G.; NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. **Inter Journal, Complex Systems** 1695(5):1-9. 2006.

- DAY, J. M.; DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. **Soil Biol Biochem** 8(1):45-50. 1976.
- DE LAJUDIE, P. M.; ANDREWS, M.; ARDLEY, J.; EARDLY, B.; JUMAS-BILAK, E. Minimal standards for the description of new gene and species of rhizobia and agrobacteria. **Int J Syst Evol Microbiol** 69(7):1852-1863. 2019.
- FUKAMI, J.; CEREZINI, □; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express** 8(1). 2018.
- FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express** 6(1). 2016.
- GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. **Comput Appl Biosci** 12(6):543-548. 1996.
- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics** 29:1072-1075. 2013.
- HARTMANN, A.; FISCHER, D.; KINZEL, L.; CHOWDHURY, S. P. Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota – Achievements and challenges. **J Adv Res** 2019; 19:3-13. 2019.
- HUNGRIA, M.; □AM□O, R. J.; SOUZA, E. M.; □EDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil** 331(1-2):413-25. 2010.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Curr Opin Microbiol** 10(5):504-509. 2007.
- KOVTUNOV, E. A.; SHELUD'KO, A. V.; CHERNYSHOVA, M. □; PETROVA, L. □; KATSY, E. I. Mutants of bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 with Omegon insertion in mmsB or fabG genes of lipid metabolism are defective in motility and flagellation. **Russ J Genet** 49 (11):1107-1111. 2013.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Mol Biol Evolution** 35(6):1547-1549. 2018.
- LAETSCH, D. R.; BLAXTER, M. L. BlobTools: Interrogation of genome assemblies version 1; peer review:2 approved with reservations. **F1000 Research** 6:1287. 2017.
- LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int J Syst Evol Microbiol** 60(12):2832-2837. 2010.
- LEE, I.; KIM, Y. O.; PARK, S. C.; CHUN, J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **Int J Syst Evol Microbiol** 66:1100-1103. 2015.

LEITE, J.; PASSOS, S. R.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. E. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. **Braz J Microbiol** 49(4):703-713. 2017.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; SHEN, F. T.; LIU, Y. □.; HSU, Y. H.; SHAHINA, M.; LAI, W.; YOUNG, C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov. sp. nov. isolated from a fermentor in Taiwan transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **A Van Leeuw J** 105(6):1149-1162. 2014.

LIN, S. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, L. S.; ZHU, Z. L.; CHEN, W. M.; YOUNG, C. C. *Azospirillum formosense* sp. nov. a diazotroph from agricultural soil. **Int J Syst Evol Microbiol** 62:1185-1190. 2012.

LU, Y. K.; MARDEN, J.; HAN, M. Metabolic flexibility revealed in the genome of the cyst-forming alpha-1 proteobacterium *Rhodospirillum centenum*. **BMC Genom** 11(1), 2010.

MARONI□HE, G. A.; GAR□ÍA, J. E.; SAL□EDO, F.; □REUS, □. M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers. **Microbiol Res** 195:1-10. 2017.

MICHEL, D. C.; PASSOS, S. R.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L. *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. **Arch Microbiol** 199(5):657-664. 2017.

ONA, O.; VAN IMPE, J.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN, J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Lett** 246(1): 1:125-132. 2005.

PALMER, M.; STEENKAMP, E. T.; BLOM, J.; HEDLUND, B. P.; VENTER, S. N. All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy published online ahead of print, 2020 [Apr 3]. **Int J Syst Evol Microbiol** 2020.

PARKS, D. H.; IMELFORT, M.; SKENNERTON, C. T.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Res** 25:1043-1055. 2014.

PRITCHARD, L.; GLOVER, R. H.; HUMPHRIS, S.; ELPHINSTONE, J. G.; Tothc Ik. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Anal Methods** 8(1):12-24. 2016.

REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Conversion of tryptophan to indoleacetic-acid by *Azospirillum-brasilense*. **Soil Biol Biochem** 11(5):547-548. 1979.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica** 2:16. 1986.

- ROSSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. **Syst Appl Microbiol** 38(4):209-216. 2015.
- SANT'ANNA, F. H.; AMBROSINI, A.; DE SOUZA, R. Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a Genomovar of *Paenibacillus sonchi*: Genome-Based Metrics Improve Bacterial Taxonomic Classification. **Front Microbiol** 8:1849. 2017.
- SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis** 25:425-431. 1998.
- STEENHOUT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev** 24(4):487-506. 2000.
- STETS, M. I.; QUINTO, A.; JR HUERGO, L. F. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **J Biotechnol** 165(3-4):167-174. 2013.
- TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. 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(8):967-980. 1978.
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Appl Environ Microbiol** 37(5):1016-1024. 1979.
- TIKHONOVA, E. N.; GROUZDEV, D. S.; KRAVCHENKO, I. K. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog. **Int J Syst Evol Microbiol** 69:2787-2793. 2019.
- VALLENET, D.; ENGELIN, S.; MORNICO, D. MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. Database (Oxford) 2009: bap021.
- VARGHESE, N. J.; MUKHERJEE, S.; IVANOVA, N.; KONSTANTINIDIS, K. T. Microbial species delineation using whole genome sequences. **Nucleic Acids Res** 43(14):6761-6771. 2015.
- ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y.; YANG, G.; ZHUANG, L.; HU, P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Int J Syst Evol Microbiol** 63:2618-2624. 2013.
- ZILLI, J. E.; ALVES, B. J. R.; ROUWS, L. F. M. The importance of denitrification performed by nitrogen-fixing bacteria used as inoculants in South America. **Plant Soil**, 2019.

5 CHAPTER III

GENOME-BASED RECLASSIFICATION OF *AZOSPIRILLUM* *BRASILENSE* AZ39 AS THE TYPE STRAIN OF *AZOSPIRILLUM* *ARGENTINENSE* SP. NOV.

Capítulo publicado como artigo na: “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology”.

FERREIRA, N. D.S.; CONIGLIO, A.; PUENTE, M.; SANT'ANNA, F. H.; MARONICHE, G.; GARCIA, J.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; VOLPIANO, C. G.; AMBROSINI, A.; et al. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 72:5475. 2022.

5.1 RESUMO

A cepa Az39^T de *Azospirillum* é uma bactéria diazotrófica promotora de crescimento de plantas isolada em 1982 das raízes de plantas de trigo que crescem em Marcos Juárez, Córdoba, Argentina. Produz ácido indol-3-acético na presença de l-triptofano como precursor, cresce a 20-38°C (ótimo 38°C) e as células são curvas ou em forma de espiral, com diâmetros variando de 0,5 a 0,9 para 1,8-2,2µm. Eles contêm C16:0, C18:0 e C18:1ω7c/ω6c como os principais ácidos graxos. A análise filogenética de sua sequência do gene 16S rRNA confirmou que esta cepa pertence ao gênero *Azospirillum*, mostrando uma estreita relação com *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T, *Azospirillum brasilense* Sp7^T e *Azospirillum formosense* CC-Nfb-7^T. A análise do gene de manutenção revelou que Az39^T, juntamente com cinco estirpes do gênero (Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035 e MTCC4036), formam um cluster além de *A. baldaniorum* Sp245^T, *A. brasilense* Sp7^T e *A. formosense* CC-Nfb-7^T. A identidade média de nucleotídeos (ANI) e a hibridização digital DNA-DNA (dDDH) entre Az39^T e as estirpes do tipo supracitado revelaram valores abaixo de 96%, o limite de circunscrição para a delimitação da espécie (ANI: 95,3, 94,1 e 94,0%; dDDH: 62,9, 56,3 e 55,6%). Além disso, uma avaliação da filogenia do proteoma central, incluindo 809 proteínas compartilhadas em comum, mostrou um agrupamento independente de Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035 e MTCC4036. O teor de G+C no DNA genômico dessas seis variou de 68,3 a 68,5%. Com base na caracterização filogenética, genômica e fenotípica combinada apresentada aqui, consideramos que a cepa Az39^T, juntamente com as estirpes Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035 e MTCC4036, são membros de uma nova espécie de *Azospirillum*, para a qual o nome *Azospirillum argentinense* sp. novembro é proposto. A estirpe tipo é Az39^T (=LBPCV39^T=BR 148428^T=CCCT 22.01^T).

Palavras-chave: Filogenias. Genoma. *Azospirillum*. Núcleo de proteoma. Genes de manutenção.

5.2 ABSTRACT

Strain Az39^T of *Azospirillum* is a diazotrophic plant growth-promoting bacterium isolated in 1982 from the roots of wheat plants growing in Marcos Juárez, Córdoba, Argentina. It produces indole-3-acetic acid in the presence of l-tryptophan as a precursor, grows at 20–38°C (optimal 38°C), and the cells are curved or spiral-shaped, with diameters ranging from 0.5–0.9 to 1.8–2.2 µm. They contain C16:0, C18:0 and C18:1 ω 7c/ ω 6c as the main fatty acids. Phylogenetic analysis of its 16S rRNA gene sequence confirmed that this strain belongs to the genus *Azospirillum*, showing a close relationship with *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T, *Azospirillum brasilense* Sp7^T and *Azospirillum formosense* CC-Nfb-7^T. Housekeeping gene analysis revealed that Az39^T, together with five strains of the genus (Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035 and MTCC4036), form a cluster apart from *A. baldaniorum* Sp245^T, *A. brasilense* Sp7^T and *A. formosense* CC-Nfb-7^T. Average nucleotide identity (ANI) and digital DNA–DNA hybridization (dDDH) between Az39^T and the aforementioned type strains revealed values below 96%, the circumscription limit for the species delineation (ANI: 95.3, 94.1 and 94.0%; dDDH: 62.9, 56.3 and 55.6%). Furthermore, a phylogeny evaluation of the core proteome, including 809 common shared proteins, showed an independent grouping of Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035 and MTCC4036. The G+C content in the genomic DNA of these six strains varied from 68.3 to 68.5%. Based on the combined phylogenetic, genomic and phenotypic characterization presented here, we consider that strain Az39^T, along with strains Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035 and MTCC4036, are members of a new *Azospirillum* species, for which the name *Azospirillum argentinense* sp. nov. is proposed. The type strain is Az39^T (=LBPCV39^T =BR 148428^T =CCCT 22.01^T).

Keywords: Phylogenies. Genome. *Azospirillum*. Proteome-core. Housekeeping genes.

5.3 INTRODUCTION

The genus *Azospirillum* belongs to the class *Alphaproteobacteria*, order *Rhodospirillales* (PFENNIG & TRUPER, 1971) and it was recently included in the new family *Azospirillaceae* as the type genus (HORDT et al., 2020, TARRAND et al., 1978). *Azospirillum* comprises non-fermentative, free-living, Gram-negative diazotrophic bacteria that do not form spores but produce intracellular granules of poly- β -hydroxybutyrate. In liquid media, these bacteria are motile through a single polar flagellum; on solid media at 30 °C, numerous lateral flagella of shorter length may be formed. *Azospirillum* members can grow under microaerophilic conditions; their cells are plump, slightly curved or straight rods, 0.6-1.7 $\times$ 2.1-3.8 μ m, often with pointed ends or spiral-shaped. Enlarged pleomorphic forms may occur in old, alkaline cultures or stressful conditions, including oxygen excess (TARRAND et al., 1978; BALDANI et al., 2015).

The growth of a spirillum-like bacterium in nitrogen deficient malate- or lactate-based media, which had been inoculated heavily with garden soil, was first observed by Martinus Beijerinck in 1922. Beijerinck considered the organism to be a member of the genus *Spirillum* and to be a bridging organism linking the genus *Spirillum* with the genus *Azotobacter*. He initially named the organism *Azotobacter spirillum* but later renamed it *Spirillum lipoferum* (BEIJERINCK, 1925). Little attention was given to this micro-organism until 1974, the year in which Johanna Döbereiner and collaborators identified these bacteria in soil samples and root samples of several grass plants (*Digitaria*, *Panicum maximum*, *Cynodon dactylon*), grain crops (wheat, maize, sorghum, millet, rice). After reclassification of the group, *Spirillum lipoferum* was considered to be composed of two strain groups belonging to *A. brasilense* and the type species *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978). In 2015, the genus *Azospirillum* was again revised, and two *Azospirillum* species (*A. amazonense* and *A. irakense*) were transferred to two new genera, *Nitrospirillum* and *Niveispirillum*, respectively (LIN et al., 2014). Twenty-five species belonging to the *Azospirillum* genus have been recognized so far at <https://lpsn.dsmz.de> (PARTE et al., 2020).

Azospirillum is one of the most studied genera among plant growth-promoting bacteria (PGPB) worldwide. Members of the genus have been commercialized as a plant inoculant in several South American countries, including Argentina, Brazil, Uruguay, and Paraguay (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994; CÁSSAN & DIAZ-ZORITA, 2016). The first inoculant in South America was registered about 25 years ago (1996) in Argentina by Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). That inoculant was formulated using the strain designated as *A. brasilense* Az39, more than one decade after its isolation by Enrique Rodríguez Cáceres-researcher from the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-from surface-sterilized roots of wheat plants cultivated in Marcos Juárez, Southern Córdoba, Argentina (RODRÍGUEZ et al., 2008). This strain was selected based on its ability to increase crop yields of maize and wheat under agronomic conditions (DIAZ-ZORITA & FERNÁNDEZ, 2009). Currently, over 100 inoculants produced by more than 70 companies in South America exist. All these products contain *A. brasilense*, and the strain Az39 is the most common active principle, present in about 75% of these products. Based on the robust knowledge accumulated after 40 years of experience with this strain, both in the laboratory and under field conditions, Az39 (known as *A. brasilense*) is considered a study model PGPB (CÁSSAN et al., 2020).

The genome sequence of Az39 was recently obtained (RIVERA et al., 2014). The genome consists of 6 replicons, including a chromosome, 3 chromids and 2 plasmids. The total size of the genome is 7,39 Mb and it contains 6,311 protein-coding sequences. Similar to other *Azospirillum* species, Az39 have multiple ribosomal operons at different replicons. A total of 87 tRNA loci are present. It has been found that the Az39 genome contains several genes related

to plant growth promotion mechanisms as those related with nitrogen fixation, phytohormones and plant growth regulators biosynthesis, biofilm formation, and type I, II, and VI secretion systems. The complete genome sequence of Az39 is available at NCBI GenBank under the accession numbers CP007793 for the chromosome and CP007794 to CP007798 for the other replicons.

Related to physiological behavior, Az39 is able to grow between 20 and 38 °C, with an optimal at 38 °C, depending on the culture médium (RIVERA et al., 2018; MOLINA et al., 2020). Like *A. brasilense* Sp7^T and *A. baldaniorum* Sp245^T-type strains of their closest species-, it has been demonstrated that Az39 is a nitrogen-fixing bacterium that produces high amounts of phytohormones such as auxins, particularly indole-3-acetic acid (IAA), as well s cytokinins, gibberellins, abscisic acid, ethylene, polyamines, and other plant growth regulators (RIVERA et al., 2018; PERRING et al., 2007; CÁSSAN et al., 2009). Az39 is unable to produce acyl-homoserine lactone (AHL) signal molecules but can interfere in the communication between other bacteria or plants by quorum quenching (GUALPA et al., 2020). Recently, it was confirmed that this strain has an active type VI secretion system (CÁSSAN et al., 2021).

Despite the phenotypic and physiologic similarities of Az39 with *A. brasilense* Sp7^T (the first *Azospirillum* strain characterized and the type strain of *A. brasilense* species), we hypothesized that Az39 might belong to a distinct species on the basis of a preliminary analysis (DNA-DNA digital hybridization and 16S rRNA gene phylogeny) (FERREIRA et al., 2020).

Aiming at clarifying the taxonomic position of Az39, we carried out phylogenomic and phenotypic analyses to compare it to other closely related strains and more than 25 additional *Azospirillum* sp. genomes. The results obtained by this polyphasic approach led us to propose the delineation of a new *Azospirillum* species, *Azospirillum argentinense*, with Az39^T as the type strain.

5.4 MATERIAL AND METHODS

5.4.1 Strain collection

This study focused on nine *Azospirillum* spp. strains (Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, MTCC4036, *A. baldaniorum* Sp245^T, *A. brasilense* Sp7^T, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T) originally isolated from roots or rhizospheric soil of different plant species (Table 7). Az19 and REC3 are deposited in the Bacterial Culture Collection (WDCM31) belonging to the Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) of INTA-Castelar, Buenos Aires, Argentina; *A. baldaniorum* Sp245^T, BR 11975, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T are deposited in the Collection of Biological Resource Centre Johanna Döbereiner (WDC364), Embrapa Agrobiologia, Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil (www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd). Information about strains MTCC4035 and MTCC4036 was obtained from the NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Az39^T is deposited in the Bacterial Culture Collection (WDCM31) at the INTA-IMYZA, Castelar, Buenos Aires, Argentina, and the Collection of Biological Resource Centre Johanna Döbereiner (WDC364) at the Embrapa Agrobiologia, Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil.

5.4.2 16S rRNA and housekeeping genes phylogenetic reconstruction

The genetic characterization involved the retrieval of the 16S rRNA and housekeeping gene sequences contained in the genomes of Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, MTCC4036, and other type strains belonging to different species of the genus *Azospirillum* deposited in the NCBI Nucleotide Database (www.ncbi.nlm.nih.gov). To analyze the 16S rRNA gene (1,265 nt), the sequences were aligned with the Muscle tool (EDGAR, 2004), and the evolutionary distance was calculated based on the maximum-likelihood tree following the Tamura-Nei method (TAMURA et al., 1993), using MEGA 11 (TAMURA et al., 2021). To describe more accurately *Azospirillum* species, genomic data (Table S2) was used to extract gene information and perform multilocus sequence analyses (MLSA). First, the UBCG script was used to obtain a concatenated multiple alignment with nucleotide sequences of a curated list of 92 housekeeping genes (Na S-I, et al., 2018), to then infer a phylogenetic tree by the Maximum-likelihood method and the Tamura-Nei model using MEGA-X (Kumar et al., 2018). Subsequently, a screening was performed concatenating only 4 housekeeping genes, *recA* (1,080 nt), *gln* (1,400 nt), *rpoD* (1,293 nt), and *atpD* (1,399 nt), in MEGA 11. In this case, alignments were performed with Muscle, and the most suitable model for the calculation and construction of the tree was determined using the model selection tool integrated within MEGA software.

5.4.3 Genome analyses

All genomes used in this analysis were retrieved from the NCBI Assembly Database (Table 8). Core-proteome phylogeny was reconstructed as described in (Sant'Anna et al., 2017). Ortholog protein groups were defined using bidirectional best-access algorithms implemented in the Get_homologues 20170609 (CONTRETRAS-MOREIRA & VINUESA, 2013; VINUESA & CONTRETRAS-MOREIRA, 2015). Each ortholog protein (clusters within inparalogs were excluded) was aligned with the Muscle tool using standard parameters; the alignments were concatenated, and the phylogeny was subsequently defined using the neighbor-joining Tamura-Nei method with MEGA 11.

Table 7. *Azospirillum* species and strains used in the study.

Species	Strain designation		First isolation and host	Country/year of collection	Reference
	Original	Other			
<i>A. argentinense</i>	Az39 ^T	LBPCV39 ^T BR 14828 ^T ; CCCT 22.01 ^T	wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) rhizosphere	Argentina, 1982	*
	Az19	-	wheat (<i>Triticum aestivum</i>) field fallow	Argentina, 1982	*
	REC3	-	strawberry (<i>Fragaria x ananassa</i>) roots	Argentina, 2005	PEDRAZA et al., 2007
	BR 11975	-	maize (<i>Zea mays</i>) roots	Brazil, 1988	FERREIRA et al., 2020
	MTCC4035	-	agricultural field, <i>Saccharum officinarum</i>	India, 2006	CHOWDHURY et al., 2007
	MTCC4036	-	agricultural field maize (<i>Zea mays</i>)	India, 2006	CHOWDHURY et al., 2007
<i>A. baldaniorum</i>	Sp245 ^T	BR 11005 ^T , IBPPM 219 ^T	wheat (<i>Triticum aestivum</i>) surface disinfected roots	Brazil, 1980	BALDANI et al., 1983
<i>A. brasilense</i>	Sp7 ^T	BR 11001 ^T ; ATCC29145 ^T ; DSM 1690 ^T ; LMG 13127	digit grass (<i>Digitaria decumbens</i>) rhizosphere	Brazil, 1974	TARRAND et al., 1978
<i>A. formosense</i>	CC-Nfb-7 ^T	BCRC 80273 ^T ; JCM 17639 ^T ; 5DSM 24137 ^T	agricultural soil	Taiwan, 2012	LIN et al., 2012

*Strains isolated in 1982 from wheat plots at Marcos Juárez, Córdoba, Argentina, by the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (INTA-IMYZA). These field assays were coordinated by Ing. Agr. Enrique Rodríguez Cáceres. Unpublished Scientific Article.

Table 8. Characteristics of the studied genomes.

Species	Strain	Genbank (Ac. number)	RefSeq assembly accession	Genome Size (Mbp)	Contigs	Protein	GC (mol%)	Coverage	Reference
<i>A. argentinense</i>	Az39	NZ_CP007793	GCF_000632475.1	7.39128	6	6,427	68,5	21	RIVERA et al., 2014
	Az19	NZ_VEWN01000000	GCF_008369925.1	7,02421	68	6,241	68,3	295.0	GARCIA et al., 2020
	REC3	NZ_POWG01000000	GCF_002895265.1	7,22895	137	6,262	68,7	30.0	FONTANA et al., 2018
	BR11975	NZ_WFKF01000000	GCF_016622125.1	7,74457	573	6,824	68,5	32.0	FERREIRA et al., 2020
	MTCC4035	NZ_CP032321	GCF_005222165.1	7,92866	8	6,904	68,5	100.0	SINGH et al., 2019
	MTCC4036	NZ_CP032330	GCF_005222185.1	8,1211	9	7,077	68,3	100.0	SINGH et al., 2019
<i>A. baldaniorum</i>	Sp245 ^T	NZ_CP022253	GCF_003119195.2	7,68239	7	6,703	68,4	145.0	FERREIRA et al., 2020
	BR 12001	NZ_VITE01000000	GCF_007827765.1	7,3645	61	6,536	68,6	204.0	FERREIRA et al., 2020
	Vi22	VSRJ00000000	GCF_013341015.1	7,440708	301	6,642	68,5	57	FERREIRA et al., 2020
	Sp7	NZ_CP033312	GCF_008274945.1	7,10024	6	6,298	68,4	100.0	unpublished
<i>A. brasilense</i>	BR 11017	WFKA00000000	GCF_013340975.1	7,29369	314	6,506	68,2	67	unpublished
	BR 11019	WFKB00000000	GCF_013340985.1	7,073989	1640	6,384	68,5	15	unpublished
	BR 11649	WFKD00000000	GCF_013340915.1	7,287852	512	6,554	68,2	23	unpublished
	BR 11002	NZ_VITX01000000	GCF_007828115.1	6,96097	42	6,184	68,4	215.0	unpublished
	MTCC4038	NZ_CP032339	GCF_005222145.1	7,13417	6	6,214	68,3	100.0	SINGH et al., 2019
	SR80	NZ_QXHE01000000	GCF_003584185.1	7,14659	231	6,318	68,3	59.0	unpublished
<i>A. formosense</i>	CC-Nfb-7 ^T	WHOR00000000	GCF_013340925.1	6,161078	569	5,702	68,6	17	unpublished
<i>A. melinis</i>	TMCY0552 ^T	WHOS00000000	GCF_013340935.1	7,970174	160	6,920	67,7	107	unpublished
<i>A. lipoferum</i>	59b ^T	NZ_VTTN01000000	GCF_008364955.1	7,98718	77	6,880	67,3	127.0	unpublished
<i>A. halopraeferens</i>	DSM 3675 ^T	NZ_AUCF01000000	GCF_000429625.1	6,512380	56	5,872	70,7	unknown	unpublished
<i>A. doebereineriae</i>	GSF71 ^T	NZ_RZIJ01000000	GCF_003989665.1	7,00006	115	6,000	68,9	250.0	unpublished
<i>A. oryzae</i>	COC8 ^T	NZ_VTTM01000000	GCF_008364795.1	6,7552	42	5,852	67,4	154.0	unpublished
<i>A. thiophilum</i>	DSM 21654 ^T	NZ_LAEL01000000	GCF_000960825.1	7,63752	11	6,516	68,2	108.39	KWAK et al., 2016
<i>A. palustre</i>	B2 ^T	NZ_PDKW01000000	GCF_002573965.1	7,99749	99	6,887	67,8	30.0	TIKHONOVA et al., 2019
<i>A. humicireducens</i>	SgZ-5 ^T	NZ_CP015285	GCF_001639105.2	6,8627	29	5,853	67,4	259.0	ZHOU et al., 2013
<i>A. ramasamyi</i>	M2T2B2 ^T	NZ_CP029829	GCF_003233655.1	6,31626	8	5,408	67,9	154.0	ANANDHAM et al., 2019
<i>A. thermophilum</i>	CFH 70021 ^T	NZ_CP029352	GCF_003130795.1	6,77631	9	5,691	69,8	100.0	unpublished
<i>Rhodospirillum centenum</i>	ATCC51521 ^T	NC_011420	GCF_000016185.1	4.35554	1	3,847	70.5	unknown	LU et al., 2010

5.4.4 Genomic metrics

In order to refine our analysis, pairwise comparisons between the genomes of the 9 strains mentioned plus 10 additional *Azospirillum* type strains were carried out using average nucleotide identity (ANI) methods. The ANIb was calculated with the Python 3 module pyANI v 0.2.10 (PRICHARD et al., 2016), while the gANI and AF (alignment fraction) were calculated based on the Microbial Species Identifier (MiSI) method, as per (VARGEHESE et al., 2015). The GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator) 3.0 with the recommended BLAST + aligner was used to calculate digital DNA-DNA hybridization (dDDH) values and confidence intervals (CI) using the GGDC formula 2 (<http://ggdc.dsmz.de>); orthoANI parameters were calculated using the Ortho ANI tool (OAT) version 1.30 (www.ezbiocloud.net/tools/) (LEE et al., 2016).

The identity matrices pyANI and FastANI were grouped with the ProKlust graph-based approach implemented in the R language for downstream analysis of large identity matrices (VOLPIANO et al., 2021). To extract groups of genospecies, the chosen cut-off criterion was ANI $\geq 96\%$ (VOLPIANO et al., 2021). In addition, the pyANI alignment coverage matrix, representing the fraction of each aligned genome, was combined with ANIb, with an arbitrary cut-off $\geq 50\%$. Data were filtered using the parameters “filterDifferentNamesConnected” and “filterSameNamesNotConnected” (VOLPIANO et al., 2021).

5.4.5 Phenotype

In this work, strains Az39^T, Az19 and REC3, which consistently formed a tight cluster in all the phylogenetic analyses, were selected as representatives of the *A. argentinense* group to characterize several phenotypic parameters in comparison to type strains of the closest species *A. brasilense* Sp7^T, *A. baldaniorum* Sp245^T, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T. Initially, we evaluated the bacterial growth at different temperatures, pH ranges, and NaCl concentrations. Moreover, cell morphology, polyhydroxybutyrate (PHB) production, antibiotic sensitivity, carbon source assimilation, cellular fatty acid profile, nitrogenase activity, and IAA production were also assessed.

The growth of all the strains was tested using NYA (Nfb supplemented with 1g·L⁻¹ NH₄Cl and 0.05 g·L⁻¹ yeast extract) médium (GARCÍA et al., 2020) at 15, 20, 25, 28, 32, 36, and 38°C, and pH values from 3.0 to 10.0 (1.0 pH unit intervals). The final pH was achieved using citrate buffer for pH 3.0-5.0 (0.1 M citric acid/0.1 M trisodium citrate), phosphate buffer for pH 6.0-8.0 (0.2 M Na₂HPO₄·7 H₂O/0.2 M NaH₂PO₄), and carbonate-bicarbonate buffer for pH 9.0-10.0 (0.2 M Na₂CO₃/0.2 M NaHCO₃). Salt tolerance was determined by growing the strains in NYA medium supplemented with 0 to 5% NaCl (1% increments).

5.5 RESULTS AND DISCUSSION

5.5.1 16S rRNA and housekeeping genes phylogenetic reconstruction

16S rRNA gene phylogeny indicated a similarity of 99% or above between strains Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, and MTCC4036, also between type strains *A. baldaniorum* Sp245^T, *A. formosense* CC-Nfb-7^T, and *A. brasilense* Sp7^T (Figure 8). The similarity of Az39^T with Sp245^T, CC-Nfb-7^T, and Sp7^T was 99, 98, and 99%, respectively. However, due to the high conservation of the 16S rRNA gene, the analysis of this gene allows only the identification at the genus level. Therefore, to elucidate the *Azospirillum* species relationships, the analysis of housekeeping genes through MLSA was conducted (Figure 8). The analyses of 92 concatenated genes showed four main clusters, joining Az39^T, Az19, REC3, and BR 11975 in a well-defined clade, being this clade close to MTCC4035 and MTCC4036, with more than 99% similarity among them (Figure 9a). This clade was separated from the clusters corresponding to *A. baldaniorum* Sp245^T (98.1%), *A. brasilense* Sp7^T (97.7%), and *A. formosense* CC-Nfb-7^T (97.6%). The same result was obtained when only four housekeeping genes were considered: the clusters containing the six strains mentioned remained with similarity levels of above 99% and separated from clusters of *A. baldaniorum* Sp245^T (98.9 %), *A. brasilense* Sp7^T (98.5%), and *A. formosense* CC-Nfb-7^T (98.2%) (Figure. 9b and 9c).

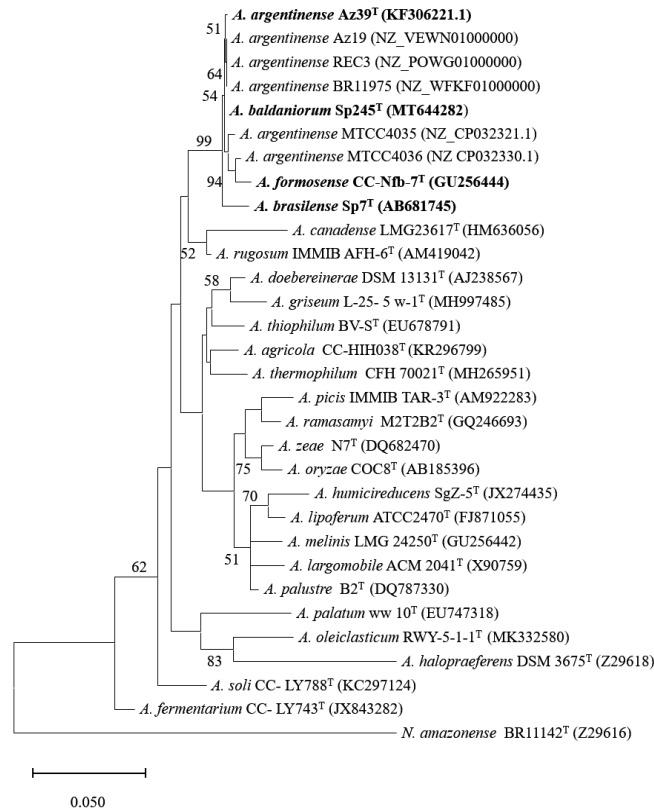


Figure 8. Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of *A. argentinense* Az39^T with respect to closely related strains and several type strains within the genus *Azospirillum*. The Tamura Nei substitution model was used. Bootstrap values were inferred from 100 replicates and are indicated at the tree nodes when $\geq 50\%$. GenBank accession numbers are provided between brackets. *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T was included as the outgroup. The bar represents one substitution per 100 nucleotide positions.

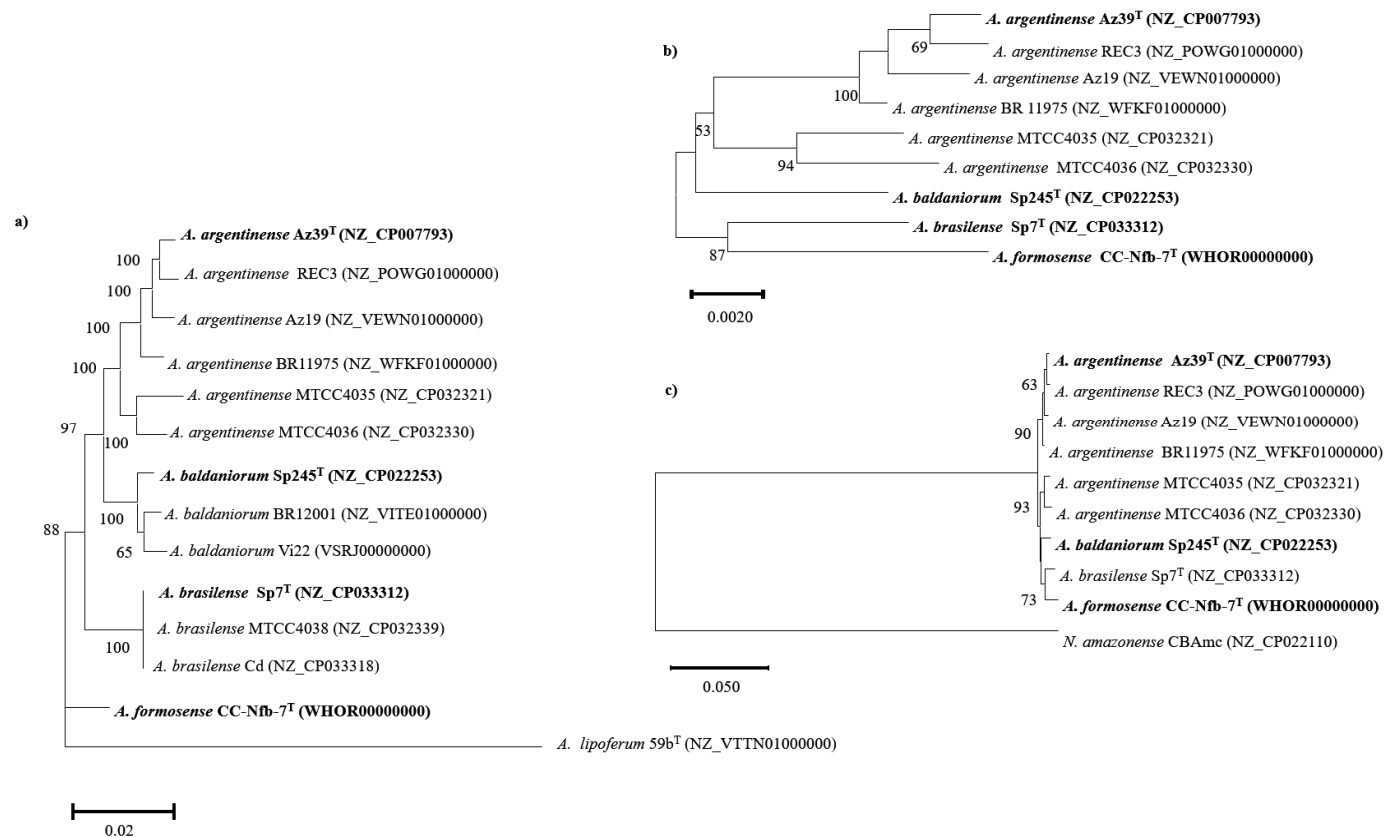


Figure 9. Phylogenetic tree inferred from MLSA of *housekeeping* genes. **a)** Analysis of 92 aligned and concatenated *housekeeping* genes showing the position of *A. argentinense* Az39^T respect to other *A. argentinense* strains and several *A. brasilense*, *A. baldaniorum*, and *A. formosense* strains, including their type strains. *A. lipoferum* 59b^T was used as the root; **b** and **c)** Unrooted and rooted (outgroup: *Nitrospirillum amazonense* CBAmC) phylogenetic tree based on multiple concatenated alignments of 4 housekeeping genes (*atpD*, *glnII*, *recA*, and *rpoD*) showing the position of *A. argentinense* Az39^T respect to other *A. argentinense* strains and *A. brasilense* Sp7^T, *A. baldaniorum* Sp245^T, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T. Gene sequences were extracted from the genome listed in Table 3. Bootstrap values were inferred from 500 repeats and are indicated at tree nodes when $\geq 50\%$. The bar represents an estimated substitution per 100 nucleotide positions.

5.5.2 Genome analyses

Apart from improving the genome analysis resolution, we used core proteome analysis to infer the phylogenetic position of the suggested new species. The size of the proteomes used in this analysis ranged from 5408 to 7137 proteins. The core proteome was composed of 809 proteins, and the concatenated alignment contained 249,640 positions. The phylogenetic reconstruction of the core proteome demonstrated that the strains Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, and MTCC4036 form a distinct group, separate from *A. brasilense* Sp7^T, *A. baldaniorum* Sp245^T, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T (Figure 10), corroborating the results of MLSA analyses shown in Fig. 9. In this way, the separation of the Az39^T cluster from *A. baldaniorum* Sp245^T and *A. brasilense* Sp7^T clusters was corroborated.

Taking into account the results of the 16S rRNA gene and housekeeping genes phylogenetic reconstruction, as well as that of the core proteome, we consider that Az39^T, together with Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, and MTCC4036, classified as *A. brasilense* members until now, may represent a new species of *Azospirillum*, being this species phylogenetically closer to *A. baldaniorum* Sp245^T than to other species of the genus.

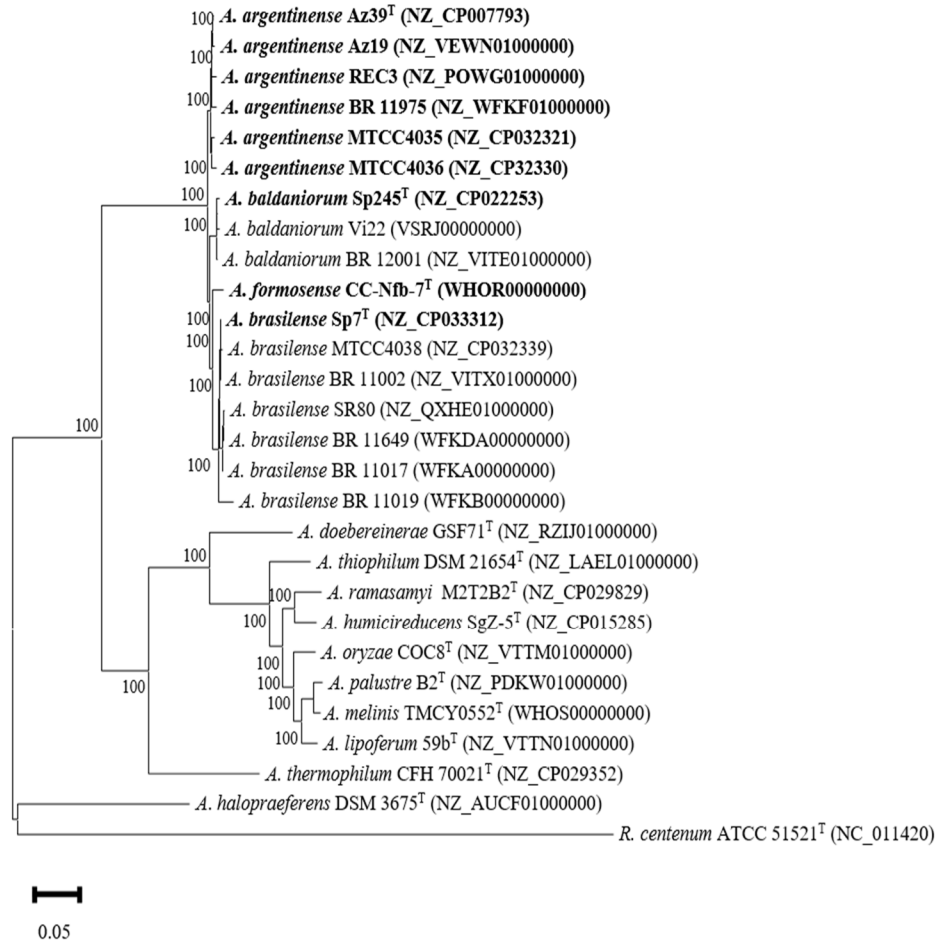


Figure. 10. Core-proteome phylogeny of *Azospirillum* strains and species showing the position of strain Az39^T with respect to closely related strains and all the type strains within the genus *Azospirillum*. The core-proteome rooted tree was reconstructed using the maximum-likelihood method. Bootstrap values were inferred from 1000 replicates. *Rhodospirillum centenum* SW ATCC 51521^T was included as the outgroup.

5.5.3 Genomic metrics

As shown in Table 9, ANI calculations demonstrated values above 96.67% among all the strains within the Az39^T-cluster (i.e. strains Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, and MTCC4036). These values ranged from 94.17% to 95.6% for the comparison of strain Az39^T with *A. brasilense* Sp7^T; from 95.3 to 96.0% for the comparison of Az39^T with *A. baldaniorum* Sp245^T; and from 94.0 to 95.0% for the comparison of Az39^T with *A. formosense* CC-Nfb-7^T (ANIb and gANI, respectively). Furthermore, dDDH calculations showed values above 72.2 mol% among the strains within the Az39^T-cluster; but 62.9, 56.3, and 55.6 between Az39^T and Sp245^T, Sp7^T, and CC-Nfb-7^T, respectively (Table 9). Thus, the strains within the Az39^T-cluster showed values below the cut-off limit of the species circumscription (96%) in relation to *A. brasilense* Sp7^T, *A. formosense* CC-Nfb-7^T, and *A. baldaniorum* Sp245^T and, therefore, would not belong to these species.

Table 9. Genomic metrics of *A. argentinense* Az39^T respect to strains of the same cluster and other type strains.

Species	Strain	<i>A. argentinense</i> Az39 ^T				
		ANIm (%)	ANIb (%)	OrthoANI (%)	gANI (%)	dDDH (mol%)
	Az39 ^T	100	100	100	100	100
<i>A. argentinense</i>	Az19	98.43	98.36	98.44	98.58	86.20
	REC3	98.97	98.94	98.99	99.10	91.30
	BR 11975	98.36	98.19	98.36	98.54	85.00
	MTCC4035	96.87	96.67	96.87	97.22	72.20
	MTCC4036	97.00	96.80	97.03	97.35	73.50
	Sp7 ^T	94.52	94.17	94.38	95.06	56.30
<i>A. baldaniorum</i>	Sp245 ^T	95.62	95.32	95.45	96.06	62.90
<i>A. formosense</i>	CC-Nfb-7 ^T	94.36	94.01	94.22	95.03	55.60
<i>A. melinis</i>	TMCY0552 ^T	85.72	80.06	79.65	81.24	24.10
<i>A. lipoferum</i>	59b ^T	85.48	79.48	79.15	80.88	23.40
<i>A. halopraeferens</i>	DSM 3675 ^T	84.27	77.95	77.04	79.24	21.80
<i>A. doebereineriae</i>	GSF71 ^T	85.54	80.33	79.92	81.58	23.90
<i>A. oryzae</i>	COC8 ^T	85.48	79.72	79.21	81.04	23.60
<i>A. thiophilum</i>	DSM 21654 ^T	85.61	79.99	79.54	81.15	23.80
<i>A. palustre</i>	B2 ^T	85.65	79.80	79.57	81.32	24.00
<i>A. humicireducens</i>	SgZ-5 ^T	85.51	79.70	79.32	81.03	23.60
<i>A. ramasamyi</i>	M2T2B2 ^T	85.54	80.16	79.62	81.27	24.00
<i>A. thermophilum</i>	CFH 70021 ^T	85.51	80.56	80.20	82.08	23.90

Bold values indicate circumscription limits within the proposed species. Species circumscription thresholds: ANIm, ANIb, and OrthoANI: 96%, gANI: 96.5%, dDDH: 70% (using formula 2, recommended at [http:// ggdc. dsmz. de/ ggdc. php](http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php)). Access number of the reference strain deposited in NCBI genome database: Sp245^T (GCF_003119195.2), Sp7^T (GCF_008274945.1), CC-Nfb-7^T (GCF_013340925.1), and Az39^T (GCF_000632475.1).

The gANI value between *A. baldaniorum* Sp245^T and Az39^T was less than 96.5%, and the dDDH between these two strains was less than 70% (threshold). Thus, we obtained acceptable ANI values, but some were very close to the constituency limit. Therefore, for metric ANI analysis, we considered that more than one method should be used in genomic analysis due to the small variations and the robustness of each analysis. We also highlight the indications of (YOON et al., 2017), who consider the computational cost and execution time as critical points when a large number of genomes must be analyzed, and the possibility of some comparison bias related to the size, quality, and coverage of the genome analysis. In this regard,

some previous works consider that the evaluation of coverage statistics can indicate contamination and that a genome may be incomplete or may contain a large number of sequences not considered by a specific type of assembly for which, invariably, some cases cannot be resolved purely based on the ANI and require further clarification through data retrieved from the literature (CIUFO et al., 2018). However, we followed the definitions established in our previous works (Ferreira et al., 2020), where values of 96% for ANI, 96.5% for gANI, and 70% for dDDH, using formula 2, were adequate cut-off limits to define species within the *Azospirillum* genus.

The ProKlust analysis (network analysis), based on graphics implemented in the R language, clearly shows the similarity of the strains Az39^T, Az19, REC3, BR 11975, MTCC4035, and MTCC4036 (Figure. 11). These results, together with those of the housekeeping genes phylogeny and the core-proteome evaluation, led us to consider that, effectively, the cut-off values in our ANI analyses were appropriate to define the new *Azospirillum* species.

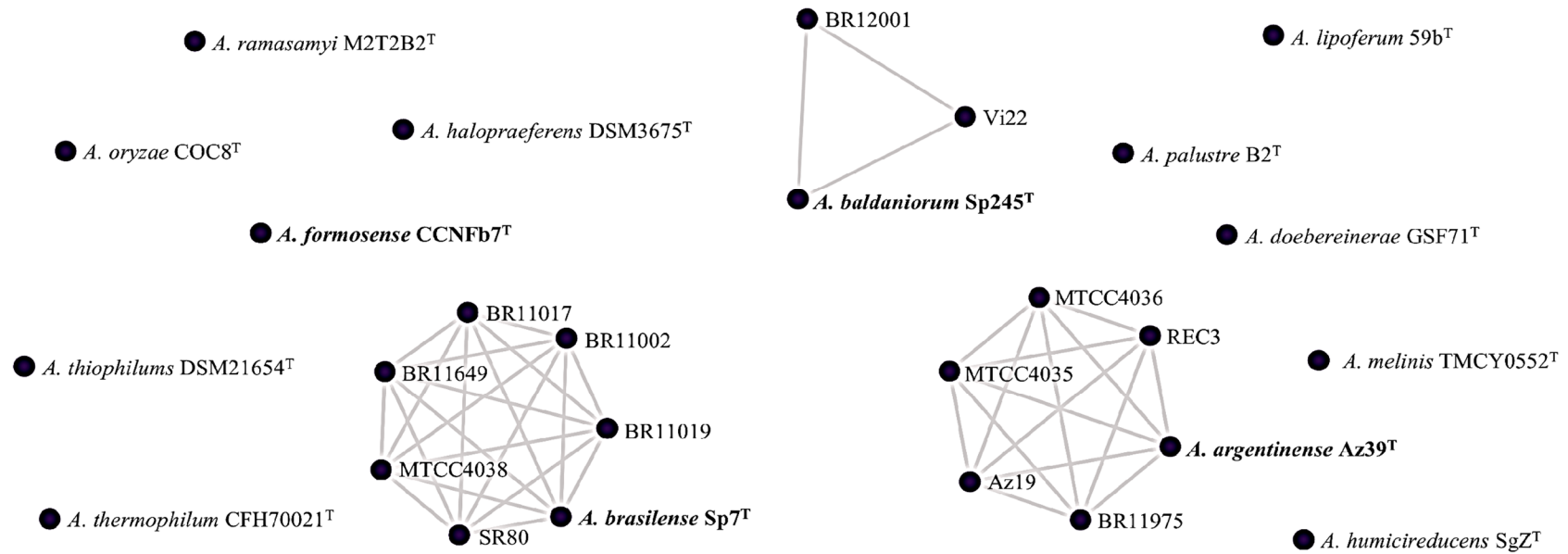


Figure 11. Genomic clusters detected using ProKlust, with pairwise ANI values from the genomes. In the graph, the clusters have nodes corresponding to genomes and edges corresponding to ANI values above the cut-off for species delineation ($\geq 96\%$ of ANI). In the case of ANIb from pyANI, where an alignment coverage matrix was also generated, the edges additionally correspond to a reliable alignment between the set of genomes (50% of alignment coverage). The ProKlust analysis (network analysis) clearly shows the similarity of the strains Az39^T, AZ19, REC3, BR 11975, MTCC4035, and MTCC4036 in comparison with the *A. baldaniorum* and *A. brasilense* clusters and other strains belonging to the genus *Azospirillum*.

5.5.4 Phenotype

Cell morphology was studied through environmental scanning electron microscopy (ESEM, FEI ESEM Quanta 200). Gram staining was performed as described by Murray et al. (MURRAY et al., 1994). Polyhydroxybutyrate (PHB) production was analyzed in liquid NYA medium. Tubes with 6 mL of culture medium (three independent replicates) were inoculated with 60 μ L of starter cultures grown overnight in NYA. After 48 h incubation at 28 °C and 150 rpm (orbital shaking), cultures were centrifuged at 3,000 $\times$ g for 5 min, and the bacterial pellet was resuspended in saline solution to an OD₅₆₀ of about 1. Cellular PHB content was quantified using 0.2 mL of adjusted bacterial suspensions, following the Nile red protocol developed by (ALVES et al., 2017). Fluorescence was measured using a microplate reader (SpectraMax® Gemini™ EM from Molecular Devices®) with Ab 533 nm/Em 635 nm and expressed as fluorescence arbitrary units (AU).

Antibiotic sensitivity was analyzed by the disc diffusion method (CLSI, 2012). To this end, Petri dishes containing 15 mL of Mueller-Hinton agar (MHA) were overlaid with 5 mL of warm MHA inoculated with 0.1 mL of bacterial suspensions obtained from cultures at the exponential phase. After solidification, Whatman filter paper discs (6 mm) embedded with antibiotics were carefully arranged on the top of the plates (4 discs per plate) and incubated at 34 °C for 48 h to finally measure inhibition halos diameter.

Cellular fatty acid methyl esters were extracted and identified according to the protocol of the Sherlock® Microbial Identification system (MIDI, version 4.5), using the RTSBA6 aerobe library (SASSER et al., 2001). Samples preparation was performed according to the manufacturer's recommendation from a single colony developed on trypticase soybean agar (TSA) for 24 h at 30 °C.

The enzymatic activities were analyzed by the use of the API 20NE kit (bioMérieux®), while carbon sources assimilation was tested with the GNIII MicroPlate system (Biolog®), following the method previously described (MICHEL et al., 2017).

The indole-3-acetic acid (IAA) concentration in the culture medium was evaluated according to (RIVERA et al., 2018). Briefly, stationary cultures of each strain obtained in NYA supplemented with 10 mg.L⁻¹ of L-tryptophan were centrifuged at 13,500 $\times$ g for 10 min to collect the supernatant for evaluation. Identification and quantification of IAA were conducted by reverse-phase HPLC (JENSEN et al., 1995).

The acetylene-reduction assay (ARA) described by (HARDY et al., 1973) allowed the assessment of the nitrogen-fixing capability. Briefly, vials (30 mL) containing 10 mL of semi-solid NFB medium were inoculated with each strain, sealed with rubber septa, and incubated at 30 °C in a dark incubator. After 72 h, 10% (v/v) of the air phase was replaced with acetylene (KOCH & EVANS, 1966), and the vials were re-incubated. The amount of ethylene released was monitored for a total of 24 h in a gas chromatograph (FID Gas Chromatograph), according to (Reis & Dobereiner, 1998).

The cells of strains Az39^T, Az19, and REC3 are Gram-negative, slightly curved rods; their dimensions are 2.2-2.3 $\times$ 0.6-0.7 μ m, 1.5-1.7 $\times$ 0.6-0.7 μ m, and 1.5-1.8 $\times$ 0.5-0.9 μ m, respectively (Figure 12). In the NYA medium, Az39^T and Az19 are able to grow between 20 and 38 °C, with an optimal around 28 °C and 32 °C, respectively, at pH 6.0-8.0. They tolerate up to 5.0% (w/v) of NaCl in the culture medium. REC3 can grow between 15 and 38 °C, with an optimal around 32°C, at a pH range between 4.0 and 8.0; this strain tolerates up to 1.0% (w/v) of NaCl.

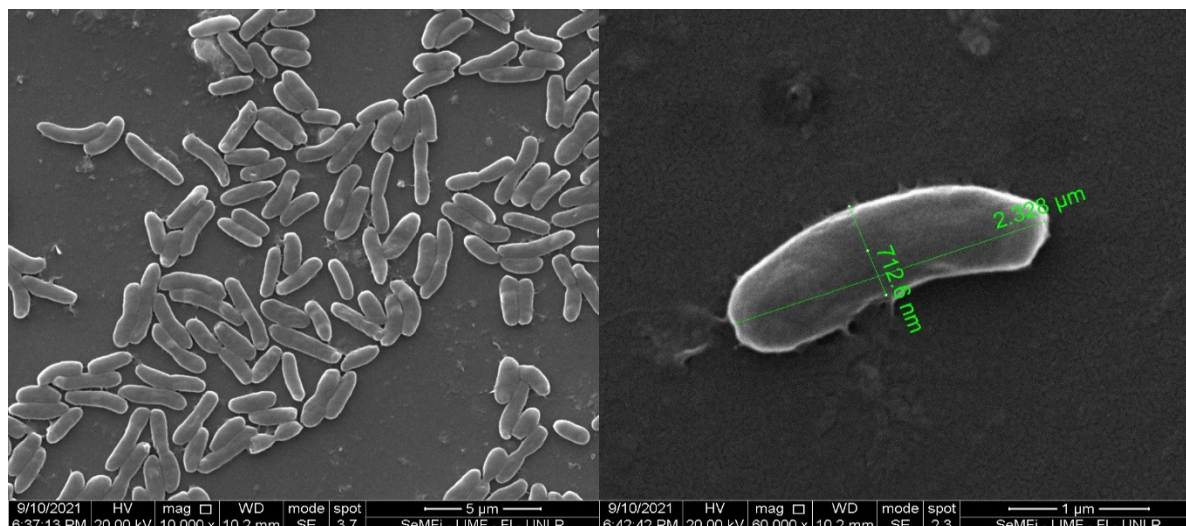


Figure 12. Scanning electron microscopy images of strain Az39^T grown for 48h in NYA medium. Scale bar: left (5μm); right (1μm).

PHB levels in the NYA medium were similar for the three strains analyzed (Table 10). No clear differential features regarding fatty acid content could be observed between Az39^T, Az19, and REC3 group, and other type strains evaluated in this work (Table S4). These results agree with those reported at genus level (BALDANI et al., 2015). The main fatty acids (>5%) shared by Az39^T, Az19, and REC3 were C_{16:0} (22.6, 16.5, and 12%, respectively), C_{18:0} (13.1, 8.1, and 7.9%, respectively), and C_{18:1} *ω*7*c*/C_{18:1} *ω*6*c* (summed feature 8) (16.7, 44.7, and 11.6%, respectively). Az39^T and REC3 also shared 18:3 *ω*6*c* (6,9,12) (5.4 and 17.8%, respectively) and C_{16:0} N alcohol (6.4 and 10.9%, respectively). Az39^T and Az19 shared C_{16:1} *ω*7*c*/C_{16:1} *ω*6*c* (summed feature 3) (5.8 and 7.9%, respectively). REC3 also presented C_{14:1} *ω*5*c* (5.2%) (Table 11-).

Table 10. Comparison of the cellular fatty acid contents (%) of strains within the genus *Azospirillum*.

Strain	<i>A. argentinense</i> Az39 ^T	<i>A. argentinense</i> Az19	<i>A. argentinense</i> REC3	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	<i>A. formosense</i> CC- Nfb ^T
Saturated						
C _{12:0}	3.48	-	-	3.89	4.39	-
C _{14:0}	2.02	-	2.18	-	-	2.15
C _{16:0}	22.67	16.51	12.07	20.98	11.09	7.16
C _{18:0}	13.10	8.10	7.91	11.66	8.10	4.37
Unsaturated						
C _{14:1} <i>ω</i> 5 <i>c</i>	3.09	-	5.27	-	-	2.82
C _{16:1} <i>ω</i> 9 <i>c</i>	-	-	-	-	5.19	2.97
C _{17:1} <i>ω</i> 5 <i>c</i>	-	2.51	-	-	-	2.55
C _{17:1} iso <i>ω</i> 5 <i>c</i>	2.88	3.13	4.16	4.45	4.27	3.48
C _{17:1} anteiso <i>ω</i> 9 <i>c</i>	2.01	1.61	3.37	-	2.70	-
C _{18:1} <i>ω</i> 5 <i>c</i>	-	-	-	-	-	1.72
C _{18:3} <i>ω</i> 6 <i>c</i> (6,9,12)	5.44	3.08	17.89	7.89	21.25	10.24
C _{19:0} cyclo <i>ω</i> 8 <i>c</i>	-	-	1.76	-	-	2.37
Branched						
C _{14:0} anteiso	0.90	-	2.01	-	-	1.32
C _{16:0} anteiso	-	-	-	-	-	4.66
C _{17:1} anteiso A	-	-	-	-	-	3.17
C _{19:0} anteiso	-	-	1.59	-	-	-
C _{14:1} iso E	-	2.27	-	10.80	6.98	-
C _{15:1} iso G	2.92	-	2.02	-	-	-
C _{16:1} iso H	1.23	-	-	-	-	-
C _{18:1} iso H	-	-	-	-	-	3.85
C _{16:0} N alcohol	6.43	3.12	10.91	-	6.61	6.74
Hydroxy						
C _{16:0} 3-OH	-	1.52	-	-	-	-
C _{17:0} iso 3-OH	2.20	2.55	4.41	5.78	3.36	4.16

To be continued...

Continuation of **Table 10.**

Strain	<i>A. argentinense</i> Az39 ^T	<i>A. argentinense</i> Az19	<i>A. argentinense</i> REC3	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	<i>A. formosense</i> CC- Nfb ^T
C _{17:0} 2-OH	-	-	-	-	-	2.54
C _{18:1} 2-OH	-	2.88	TR	-	-	-
Summed feature*						
3	5.84	7.95	-	-	-	-
6	-	-	1.60	-	-	-
7	1.54	-	-	-	-	1.02
8	16.77	44.76	11.68	27.78	24.07	3.82

*Summed Features are fatty acids that cannot be resolved reliably from another fatty acid using the chromatographic conditions chosen. The MIDI system groups these fatty acids together as one feature with a single percentage of the total. Summed feature 3 contains 16:1 *ω*7*c*/16:1 *ω*6*c*; summed feature 6 contains 19:1 *ω*11*c*/19:1 *ω*9*c*; summed feature 7 contains 19:1 *ω*7*c*/19:1 *ω*6*c*/19:0*cy*; summed feature 8 contains 18:1 *ω*7*c*/18:1 *ω*6*c*. All data are from this study. TR, trace (less than 1%). (-) no detected.

API 20NE panel showed that *A. argentinense* Az39^T, Az19 and REC3, *A. brasilense* Sp7^T, *A. baldaniorum* Sp245^T, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T were positive for nitrate reductase, urease, glucose fermentation, β -glucosidase, and β -galactosidase activities, but negative for indole production, and could not assimilate phenylacetic acid (Table 11) Az19 was unable to assimilate *N*-acetylglucosamine, D-maltose, and trisodium citrate. Strains Az39^T, Az19, REC3, and CC-Nfb-7^T were able to utilize α -D-Glucose. Like *A. formosense* CC-Nfb-7^T, *A. argentinense* Az19 could not utilize adipic acid (Table 11).

Table 11. Biochemical characteristics of *A. argentinense* Az39^T strains and related *Azospirillum* species.

Characteristics	<i>A. argentinense</i> Az39 ^T	<i>A. argentinense</i> Az19	<i>A. argentinense</i> REC3	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	<i>A. formosense</i> CC- Nfb-7 ^T
Enzyme activity						
Nitrate reduction (NO ₃)	+	+	+	+	+	+
indol production	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+
β-glucosidase	+	+	+	+	+	+
β-galactosidase	+	+	+	+	+	+
catalase	+	+	+	+	+	+
oxidase	+	+	+	+	+	+
Carbon source						
Dextrin	-	-	-	+	+	+
D-Trehalose	-	-	-	+	+	+
D-Cellobiose	-	-	-	+	+	+
Sucrose	-	-	-	+	+	+
D-Turanose	-	-	-	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-	+	+	+
α-D-Lactose	-	-	-	+	+	+
β-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	+	+	+
N-Acetyl-D-Glucosamide	-	+	-	+	+	+
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	-	+	+	+
D-Mannose	-	-	-	+	+	+
Inosine	-	-	-	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	+	+	+
D-Mannitol	-	-	-	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	+	+	+	+	+	+
L-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+

To be continued...

Continuation of **Table 11.**

Characteristics	<i>A. argentinense</i> Az39 ^T	<i>A. argentinense</i> Az19	<i>A. argentinense</i> REC3	<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	<i>A. formosense</i> CC- Nfb-7 ^T
Carbon source						
L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Histidine	-	-	-	+	+	+
L-Pyroglutamic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Serine	-	-	-	+	+	+
D-Gluconic Acid	+	+	+	+	+	+
Quinic Acid	-	-	-	+	+	+
D-Saccharic Acid	-	-	-	+	+	+
p-Hydroxy-phenylacetic Acid	-	-	-	+	+	+
Methyl Pyruvate	+	+	+	+	+	+
Citric Acid	-	-	-	+	+	+
α -Keto-Glutaric Acid	-	-	-	-	-	-
Bromo-Succinic Acid	+	+	+	+	+	+
Tween 40	-	-	-	+	+	+
γ -Amino-Butyric Acid	+	+	+	+	+	+
α -Hydroxy-Butyric Acid	+	+	+	+	+	+
α -Keto-Butyric Acid	+	-	+	-	-	-
Propionic Acid	+	+	+	+	+	+
Acetic Acid	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	-	+	+	+	+
D-Maltose	+	-	+	+	+	+
Potassium gluconate	+	+	+	+	+	+
Malic acid	+	+	+	+	+	+
Trisodium citrate	+	-	+	+	+	+
Phenyl acetic acid	-	-	-	-	-	-

+ Positive; - Negative.

The diffusion disc test showed that all *Azospirillum* spp. strains were resistant to trimethoprim (20) and sensitive to erythromycin (10), rifampicin (25), gentamicin (10), and tetracycline (10). *A. argentinense* Az39^T, Az19 and REC3, and *A. brasilense* Sp245^T showed resistance to ampicillin (100) in comparison to *A. brasilense* Sp7^T, which showed intermediate resistance, and *A. formosense* CC-Nfb-7^T, which showed sensitivity. However, *A. argentinense* Az39^T and REC3 showed intermediate resistance to kanamycin (25) compared with the other strains, considered sensitive to this antibiotic (Table 12).

Table 12. Antibiotic sensitivity profile of *A. argentinense* Az39^T and related species.

Strain	Antibiotic (μg.disc ⁻¹)								
	Ap (100)	Km (25)	Tc (10)	Gm (10)	Sp (50)	Tp (20)	Cm (10)	Rf (25)	Em (10)
<i>A. argentinense</i> Az39 ^T	R	I	S	S	S	R	S	S	S
<i>A. argentinense</i> Az19	R	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>A. argentinense</i> REC3	R	I	S	S	S	R	S	S	S
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^T	R	S	S	S	I	R	S	S	S
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	I	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7 ^T	S	S	S	S	S	R	I	S	S

Ap: ampicillin; Km: kanamycin; Tc: tetracycline; Gm: gentamicin; Sp: spectinomycin; Tp: trimethoprim; Cm: chloramphenicol; Rf: rifampicin; Em: erythromycin; **R**: resistant (diameter < 10 mm); **I**: intermediate (10 mm < diameter < 16 mm); S: sensitive (diameter > 16 mm).

IAA production was confirmed in all *Azospirillum* spp. strains cultured in NYA modified by the addition of L-tryptophan. The average production for all *Azospirillum* species was 37.2 μg.mL⁻¹; for *A. argentinense* Az39^T, Az19, and REC3, the average was 36.9 μg.mL⁻¹. In the particular case of Az39^T, the IAA production reached 37.2 μg.mL⁻¹, while it was 31.4 μg.mL⁻¹ in Az19 and 42.1 μg.mL⁻¹ in REC3 (Table 13). Similar differences in auxins production between Az39^T and Az19 were previously reported (GARCÍA et al., 2017). No genomic differences were identified for Az39^T, Az19 and REC3 regarding auxins biosynthesis pathway genes or *ipdC* sequence, which is considered the most important gene for IAA biosynthesis in this genus (CÁSSAN et al., 2013). All the strains could reduce acetylene to ethylene at a mean rate of 37.2 nmol ethylene h⁻¹ at 30 °C, while the average for *A. argentinense* Az39^T, Az19, and REC3 was 37.9 nmol ethylene h⁻¹ (considering a titer of 10⁸ cells). The acetylene reduction activity reached 42.1, 38.1, and 33.4 nmol ethylene h⁻¹ in Az39^T, Az19, and REC3, respectively. These values were higher than the ones obtained with *A. brasilense* Sp7^T and *A. formosense* CC-Nfb-7^T, but lower than Sp245^T activity. No clear differences in gene content within the *nif*, *ntr* or *gln* clusters were identified in their genome to explain these differences. In the case of CC-Nfb-7^T, the nitrogen-fixing activity was similar to that previously reported by Lin et al. 20128 (Table 13).

Table 13. Physiological features of *A. argentinense* Az39^T and related strains and species.

Characteristics	<i>A. argentinense</i> Az39 ^T	<i>A. argentinense</i> Az19	<i>A. argentinense</i> REC3	<i>A. brasiliense</i> Sp7 ^T	<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	<i>A. formosense</i> CC- Nfb-7 ^T
Growth parameters						
pH range	6.0-8.0	6.0-8.0	4.0-8.0	6.0-8.0	4.0-8.0	5.0-8.0
Growth with NaCl	1.0-5.0%	1.0-5.0%	1.0%	1.0-5.0%	1.0%	1.0-3.0%
Temperature range	20.0-38.0 °C	20.0-38.0 °C	15.0-38.0 °C	20.0-38.0 °C	20.0-38.0 °C	15.0-38.0 °C
PHB production	1205.9 AU	1206.4 AU	1326.2 AU	1246.2 AU	681.0 AU	1240.9 AU
Enzyme activity						
Glucose fermentation	+	+	+	–	–	+
Arginine dihydrolase	–	–	–	–	–	+
Gelatin hydrolysis	–	–	–	–	–	+
Carbon source						
Gentibiose	–	–	–	–	+	+
D-Melibiose	–	–	–	–	+	+
α-D-Glucose	–	–	–	–	+	+
D-Fructose	+	+	+	–	+	+
D-Galactose	+	+	+	–	+	+
L-Fucose	+	+	+	–	+	+
L-Rhamnose	–	–	–	–	+	+
D-Arabitol	–	–	–	–	+	+
D-Glucose-6-phosphate	–	–	–	–	+	+
D-Serine	–	–	–	+	+	–
D-Galacturonic Acid	+	+	+	–	+	+
D-Glucuronic Acid	+	+	+	+	+	–
Glucuronamide	+	+	+	–	+	+
Formic Acid	–	+	+	–	+	+
Capric acid	–	–	–	–	–	+
Adipic acid	+	–	+	+	+	–
Plant growth promotion						
IAA (µg.mL ⁻¹)*	37.2	31.4	42.1	37.4	37.7	37.5
ARA (nmol ethylene h ⁻¹)	42.1	38.1	33.4	28.0	57.1	24.5

(+) Positive; (–) Negative. ARA: acetylene reduction assay; AU: fluorescence arbitrary units. *NYA medium modified by the addition of L-tryptophan.

5.6 CONCLUSION

Description of *Azospirillum argentinense* sp. nov.: *Azospirillum argentinense* (ar.gen.ti.nen'se. N.L. neut. adj. *argentinense* referred to the geographical location of the first isolation, Argentina). Cells are curved or slightly curved rods, spiral-shaped, varying from 0.5-0.9 to 1.8-2.2 μm in diameter. Gram negative. Motile by a long polar flagellum and several lateral ones, shorter in length. Growth occurs at 20 and 38 °C (optimum 28 °C), pH range between 6.0 and 8.0 (optimum 6.8). Able to grow at 1 % (w/v) NaCl. Produce variable amounts of poly- β -hydroxybutyrate as intracellular granules, depending on the culture medium and conditions. Positive for nitrogen fixation activity under microaerophilic conditions and indole-3-acetic acid production in the presence of L-tryptophan as the precursor.

Positive reaction for nitrate reduction (NO_3^-), urease, β -glucosidase, β -galactosidase, catalase and oxidase but negative for indol preproduction. Able to use D-fructose, D-galactose, L-fucose, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucuronic acid and glucuronamide as carbon source. Also use as a carbon source glycerol, L-alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-pyroglutamic acid, methyl pyruvate, bromo-succinic acid, γ -amino-butyric acid, α -hydroxy-butyric acid, propionic acid, acetic acid, L-arabinose, potassium gluconate and malic acid. The major cellular fatty acids are $\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:0}$, and $\text{C}_{18:1} \omega 7c/\omega 6c$. Resistant to trimethoprim and sensitive to erythromycin, rifampicin, gentamicin, and tetracycline. The average nucleotide identity between the strains of the new species is above 98%. The type strain is Az39^T (=LBPCV39^T=BR 148428^T=CCCT 22.01^T), a free living diazotrophic, phytostimulatory plant growth-promoting-bacterium isolated from wheat roots in Marcos Juárez, Córdoba, Argentina. The genomic G+C DNA content of the type strain is 65.4%.

5.7 REFERENCES

- ALVES, L. P. S.; ALMEIDA, A. T.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M. A simple and efficient method for poly-3-hydroxybutyrate quantification in diazotrophic bacteria within 5 minutes using flow cytometry. **Braz J Med Biol** 50. 2017.
- ANANDHAM, R.; HEO, J.; KRISHNAMOORTHY, R.; SENTHILKUMAR, M.; GOPAL, N. O.; KIM, S. J.; KWON, S. W. *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products. **Int J Syst Evol Microbiol**. 69:1369-1375. 2019.
- BALDANI, J. I.; KRIEG, N. R.; BALDANI, V. L. D.; HARTMANN, A.; DÖBEREINER, J. *Azospirillum*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, pp. 1-35. 2015.
- BEIJERINCK, M. W. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr** 63:535. 1925.
- CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; DE CARLAN, C. L. N. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biol Fertil Soils** 56:461-79. 2020.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biol Biochem** 103:117-30. 2016.
- CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **Eur J Soil Biol** 45:12-9. 2009.
- CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI O, PENNA C, LUNA V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **Eur J Soil Biol** 45:28-35. 2009.
- CASSÁN F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. **J Plant Growth Regul** 33:440-459. 2014.
- CASSAN, F. D.; CONIGLIO, A.; AMAVIZCA, E.; MARONICHE, G.; CASCALES, E.; BASHAN, Y. et al. The *Azospirillum brasilense* type VI secretion system promotes cell aggregation, biocontrol protection against phytopathogens and attachment to the microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Environ Microbiol** 23:6257-74. 2021.
- CHOWDHURY, S. P.; NAGARAJAN, T.; TRIPATHI, R.; MISHRA, M. N.; LE RUDULIER, D.; TRIPATHI, A. K. *Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters** 267:72-79. 2007.
- CIUFO, S.; KANNAN, S.; SHARMA, S.; BADRETDIN, A.; CLARK, K.; TURNER, S. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. **Int J Syst Evol Microbiol** 68:2386-92. 2018.

CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eleventh edition. CLSI document M02 - A11. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CONTRERAS-MOREIRA, B.; VINUESA, P. GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis. **Appl Environ Microbiol** 79:7696. 2013.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **Eur J Soil Biol** 45:3-11. 2009.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res** 32:1792-7. 2004.

FERREIRA, N. D. S.; SANT'ANNA, F. H.; REIS, V. M.; AMBROSINI, A.; VOLPIANO, C. G. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 70:6203-6212. 2020.

GARCÍA, J. E.; LABARTHE, M. M.; PAGNUSSAT, L. A.; AMENTA, M.; CREUS, C. M.; MARONICHE, G. A. Signs of a phyllospheric lifestyle in the genome of the stress-tolerant strain *Azospirillum brasilense* Az19. **Syst Appl Microbiol** 43. 2020.

GARCÍA, J. E.; MARONICHE, G.; CREUS, C.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, R.; RAMIREZ-TRUJILLO, J. A.; GROPPA, M. D. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. **Microbiol Res** 202:21-9. 2017.

GUALPA, J.; LOPEZ, G.; NIEVAS, S.; CONIGLIO, A.; HALLIDAY, N.; CÁMARA, M. *Azospirillum brasilense* Az39, a model rhizobacterium with AHL quorum-quenching capacity. **J Appl Microbiol** 126:1850-60. 2020.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biol Biochem** 5:47-81. 1973.

HÖRDT, A.; LÓPEZ, M. G.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; SCHLEUNING, M.; WEINHOLD, L. M. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of *Alphaproteobacteria*. **Front Microbiol** 11:468. 2020.

JENSEN, J. B.; EGSGAARD, H.; VAN ONCKELEN, H.; JOCHIMSEN, B. U. Catabolism of indole-3-acetic acid and 4- and 5-chloroindole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.** 177:5762. 1995.

KWAK, Y.; SHIN, J. H. First *Azospirillum* genome from aquatic environments: Whole-genome sequence of *Azospirillum thiophilum* BV-S^T, a novel diazotroph harboring a capacity of sulfur-chemolithotrophy from a sulfide spring. **Marine Genomics** 25:21-24. 2016.

KOCH, B.; EVANS, H. J. Reduction of Acetylene to Ethylene by Soybean Root Nodules. **Plant Physiol** 41:1748-50. 1966.

- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol** 35:1547-9. 2018.
- LEE, I.; KIM, Y. O.; PARK, S. C.; CHUN, J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **Int J Syst Evol Microbiol** 66:1100-3. 2016.
- LIN, S. Y.; HAMEED, A.; SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek** 105. 2014.
- LIN, S. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, L. S.; ZHU, Z. L.; CHEN, W. M.; YOUNG, C. C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **Int J Syst Evol Microbiol** 62:1185-1190. 2012.
- LU, Y. K.; MARDEN, J.; HAN, M.; SWINGLEY, W. D.; MASTRIAN, S. D.; CHOWDHURY, S.; TOUCHMAN, J. W. Metabolic flexibility revealed in the genome of the cyst-forming alpha-1 proteobacterium *Rhodospirillum centenum*. **BMC Genom** 11:325. 2010.
- MICHEL, D. C.; PASSOS, S. R.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BARAÚNA, A. C.; DA SILVA, K. *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. **Arch Microbiol** 199:657-64. 2017.
- MOLINA, R.; LÓPEZ, G.; RODRIGUEZ, B.; ROSAS, S.; MORA, V.; CASSÁN, F. Evaluation of growth and motility in non-photosynthetic *Azospirillum brasilense* exposed to red, blue, and white light. **Arch Microbiol** 202:1193-1201. 2020.
- MURRAY, R.; DOETSCH, R.; ROBINOW, C. Determinative and cytological light microscopy. In: GERHARDT, P. (Ed.). **Methods for General and Molecular Bacteriology**, Washington: ASM Press; pp. 21-41. 1994.
- NA, S. I.; KIM, Y. O.; YOON, S. H.; HA, S.; MIN BAEK, I.; CHUN, J. UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. **J. Microbiol.** 56:281-5. 2018.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol Biochem** 26:1591-601. 1994.
- PARTE, A. C.; CARBASSE, J. S.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; REIMER, L. C.; GÖKER, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **Int J Syst Evol Microbiol** 70:5607-12. 2020.
- PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; PENNA, C.; RUIZ, O. A. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Appl Microbiol Biotechnol** 75:1143-50. 2007.

- PEDRAZA, R. O.; MOTOK, J.; TORTORA, M. L.; SALAZAR, S. M.; DÍAZ-RICCI, J. C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant and Soil** 295: 169-178. 2007.
- PFENNIG, N.; TRUPER, H. G. Higher Taxa of the Phototrophic Bacteria. **Int J Syst Evol Microbiol** 21:17-8. 1971.
- PRITCHARD, L.; GLOVER, R. H.; HUMPHRIS, S.; ELPHINSTONE, J. G.; TOTH, I. K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Anal Methods** 8:12-24. 2015.
- REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. **Arch Microbiol** 171:13-8. 1998.
- RIVERA, D.; MORA, V.; LOPEZ, G.; ROSAS, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. **J Appl Microbiol** 125:1774-1785. 2018.
- RIVERA, D.; REVALE, S.; MOLINA, R.; GUALPA, J.; PUENTE, M. Complete Genome Sequence of the Model Rhizosphere Strain *Azospirillum brasilense* Az39, Successfully Applied in Agriculture. **Genome Announc** 2:e00683-14. 2014.
- RODRÍGUEZ CÁCERES, E. A.; DI CIOCCO, C. A.; CARLETTI, S. M. 25 años de investigación de *Azospirillum brasilense* AZ 39 en Argentina. In: CASSÁN, F. D.; GARCÍA, D. E.; SALAMONE, I. (Eds.) *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. I International Workshop on *Azospirillum*: cell physiology, plant response and agronomic research. 1st ed., Argentina: Asociación Argentina de Microbiología p. 179-87. 2008.
- SANT'ANNA, F. H.; AMBROSINI, A.; DE SOUZA, R.; FERNANDES, G. E. C.; BACH, E. Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a genomovar of *Paenibacillus sonchi*: Genome-based metrics improve bacterial taxonomic classification. **Front Microbiol** 8:1849. 2017.
- SASSER M. **Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids**. Technical Note # 101 Microbial ID, Inc., Newark, Del. USA. 2001.
- SINGH, C.; PANDEY, P.; SINGH, D. N.; PANDEY, R.; SHASANY, A. K.; TRIPATHI, A. K. Whole-Genome Sequences of Four Indian Isolates of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology Resource Announcements** 8: e00633-19. 2019.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol Biol Evol** 10:512-26. 1993.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Mol Biol Evol** 38:3022-7. 2021.
- TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. 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** 24:967-80. 1978.

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

VARGHESE, N. J.; MUKHERJEE, S.; IVANOVA N, KONSTANTINIDIS K. T.; MAVROMMATIS K. Microbial species delineation using whole genome sequences. **Nucleic Acids Res** 43:6761-71. 2015.

VINUESA, P.; CONTRERAS-MOREIRA, B. Robust identification of orthologues and paralogues for microbial pan-genomics using GET_HOMOLOGUES: A case study of pIncA/C plasmids. **Methods Mol Biol** 1231:203-32. 2015.

VOLPIANO, C. G.; SANT'ANNA, F. H.; AMBROSINI, A.; DE SÃO JOSÉ, J. F. B.; BENEDUZI, A. Genomic Metrics Applied to Rhizobiales (*Hyphomicrobiales*): Species Reclassification, Identification of Unauthentic Genomes and False Type Strains. **Front Microbiol** 12. 2012.

YOON, S. H.; HA, S.; MIN, L. I. M. J.; KWON, S.; CHUN, J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie Van Leeuwenhoek** 110:1281-6. 2017.

6. CAPÍTULO IV

CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE ESTIRPES DO GÊNERO *NITROSPIRILLUM* PERTENCENTES AO CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS JOHANNA DÖBEREINER

6.1 RESUMO

O Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner abrange uma gama de microrganismos com potencial em crescimento vegetal de plantas. Entre essa diversidade o gênero *Nitrospirillum*, possui estirpes com potencial em uso biotecnológico. Este gênero atualmente é composto por duas espécies *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T e *Nitrospirillum iridis* DSM 22198^T. Neste estudo, conseguimos diferenciar *Nitrospirillum* spp. por meio da comparação da sequência do gene 16S rRNA e *recA* amplificados por PCR. As sequências obtidas, serviram para inferir árvores filogenéticas do gênero, que por sua vez contribuíram para classificar com sucesso 162 estirpes pertencentes a este acervo. Os resultados obtidos revelam que poucas estirpes estão intimamente relacionadas cepa-tipo de *N. amazonense* BR 11142^T, e nenhuma estirpe está relacionada a *N. iridis* DSM 22198^T. As análises filogenéticas também indicam que a estirpe *Nitrospirillum amazonense* BR11145^T CBAmC, utilizada como inoculante de cana-de-açúcar, forma um grupo separado de ambas espécies já descritas, o que sugere a descrição de novas espécies. Análises genômicas inferidas pelos valores de corte de ANI (96%) e dDDH (70%), confirmam os resultados da caracterização molecular indicando possíveis novas espécies putativas. Nossos resultados indicam a importância de ser obter maiores informações relativas as essas caracterizações, uma vez que existe uma certa escassez de informações baseadas em biologia molecular para este gênero.

Palavras-chave: CBAmC. Circunscrição. Filogenia. *Nitrospirillum*.

6.2. ABSTRACT

The Johanna Döbereiner Center for Biological Resources covers a range of microorganisms with potential for plant growth. Among this diversity, the genus *Nitrospirillum* has strains with potential for biotechnological use. This genus currently comprises two species *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T and *Nitrospirillum iridis* DSM 22198^T. In this study, differentiate *Nitrospirillum* spp. by comparing the sequence of the 16S rRNA and *recA* gene amplified by PCR. The ongoing sequences served to infer phylogenetic trees of the genus, which in turn tolerated to successfully classify 162 strains belonging to this collection. The results obtained reveal that few strains are closely related to the type-strain of *Nitrospirillum. amazonense* BR 11142^T, and no strain is related to *Nitrospirillum iridis* DSM 22198^T. The phylogenetic analyzes also indicate that the strain *Nitrospirillum. amazonense* BR11145^T CBAmC, used as a sugarcane inoculant, forms a separate group from two previously described species, which suggests the description of new species. Genomic analyzes inferred by the cutoff values of ANI (96%) and dDDH (70%) confirm the molecular characterization results indicating possible new putative species. Our results indicate the importance of obtaining more information about these characterizations, since there is a certain reduction of information treated in molecular biology for this genus.

Keywords: CBAmC. Circumscription, Phylogeny. *Nitrospirillum*.

6.3 INTRODUÇÃO

A coleção de bactérias pertencentes a espécie *A. amazonense*, começou a ser identificada a partir de diferentes plantas cultivadas na Amazônia e de cereais em Seropédica (RJ) (MAGALHÃES et al., 1983). A descrição inicial deste grupo baseou-se em testes fisiológicos e pela sua colônia característica verificada em meio batata (MAGALHÃES, 1983, BALDANI, 1984). Sua caracterização inicial a assemelhava as espécies previamente descritas do gênero *Azospirillum* (espécie *A. brasilense* e *A. lipoferum*). Entretanto, estudos mais detalhados levaram a proposição de uma nova espécie e assim foi classificada como *A. amazonense*, tendo como estirpe tipo Am14^T (ATCC 35119^T= BCRC 14279^T= DSM 3787^T) (MAGALHÃES et al., 1983, FALK et al., 1986).

Os primeiros estudos ecológicos da espécie foram realizados por AZEVEDO et al. (2005) que testaram 71 isolados obtidos de três gramíneas usadas para pasteja (*Hyparrhenia rufa*, *Digitaria decumbens* e *Pennisetum purpureum*) e três cereais (arroz, milho e sorgo) baseado nos estudos prévios de SOUTO (1982) e BALDANI (1984). Posteriormente REIS JR et al., (2004). isolou diversos *A. amazonense* de três espécies de *Brachiaria* colhidos nos cerrados e na estação experimental da Ceplac, Bahia (Cerrado sob Latossolo Vermelho-Escuro (Santo Antônio de Goiás, GO) e de Mata Atlântica sob Argissolo Amarelo (Itabela, BA): *B. decumbens* (12), *B. humidicola* (15) e *B. brizantha* (10). A partir daí novos isolamentos e caracterizações foram feitas e adicionadas à coleção.

Estudos prévios demonstraram sua significativa contribuição na fixação biológica de nitrogênio em cereais como arroz (RODRIGUES et al. 2008) eficiência do uso de N em milho dos REIS JUNIOR et al., (2008). Mais tarde, também foi isolado de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), entre outras espécies (BALDANI e BALDANI, 2005). Especificamente, a estirpe BR 11145^T (CBAmC) isolada de um caule de cana-de-açúcar, tem sido utilizado em inoculante de cana-de-açúcar em consórcio ou não com outras estirpes fixadoras de nitrogênio (OLIVEIRA et al. 2002, 2006; SCHULTZ et al. 2012, 2014, SCHWAB et al., 2018).

Em 2014, a espécie *Azospirillum amazonense* foi reclassificada e definida como *Nitrospirillum amazonense* por LIN et al., (2014). Tal mudança possibilitou a criação do gênero *Nitrospirillum* que atualmente é constituído de duas espécies: *Nitrospirillum amazonense* (Am14^T=BR 11142^T), *Nitrospirillum iridis* DSM 22198^T. (MAGALHÃES et al., 1983; LIN et al., 2014). Desde a descoberta da espécie *Nitrospirillum amazonense* na década de 80 (MAGALHÃES et al., 1983), diversos trabalhos sobre sua fisiologia, genética entre outras vem sendo elucidados.

Apesar do potencial biotecnológico do gênero *Nitrospirillum*, o conhecimento sobre a diversidade destas espécies é escasso. Visando a possibilidade de um maior conhecimento sobre as estirpes contidas no banco de germoplasma do Centro de Recursos Biológicos da Embrapa Agrobiologia, o presente trabalho objetivou definir a filogenia das estirpes depositadas bem como verificar a possibilidade de novas espécies dentro deste gênero e, esclarecer o posicionamento taxonômico da estirpe BR 11145 CBAmC, verificando se de fato é uma estirpe pertencente a espécie de *N. amazonense*. Esta classificação se faz importante pois é a estirpe recomendada como inoculante de cana-de-açúcar no Brasil. Para isso foram estudadas 162 estirpes isoladas de diversas regiões do país.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Estirpes bacterianas

O estudo inclui 162 estirpes de *Nitrospirillum* spp., (Tabela 14) e duas cepas tipo descritas para este gênero *N. amazonense* BR 11142^T isolada de rizosfera de *Digitaria decumbens* (Brasil) e *N. iridis* DSM 22198^T, isolada de solo/rizosfera de *Iris ensata* var. *spontanea* (Coréia do Sul). Todos os isolados exceto *Nitrospirillum iridis* DSM 22198^T, são pertencentes ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (WDC364), Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro-Brasil (www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd). Essa representatividade de estirpes inclui bactérias depositadas desde 1960 até a data de junho/2018. As estirpes foram recuperadas seguindo o controle de qualidade e preservação de microrganismos regidas pelo CRJ-JD.

Tabela 14. Informações gerais das principais característica de depósito das estirpes de *Nitrospirillum*.

Local de Origem	Hospedeiro	Substrato	Nº Estirpes
Brasil	<i>Brachiaria brizantha</i>	-	13
Brasil	<i>Brachiaria decumbens</i>	-	20
Brasil	<i>Brachiaria humidicola</i>	-	10
Brasil	<i>Hyparrhenia rufa</i>	Raiz	01
Índia	<i>Cocos nucifera</i>	-	02
Brasil	<i>Oryza sativa</i> L.	-	43
Brasil	<i>Sorghum vulgare</i>	Raiz	11
Brasil	<i>Pennisetum purpureum</i>	Raiz	01
Brasil	<i>Saccharum officinarum</i>	Ramo/colmo	01
Brasil	<i>Zea mays</i>	Raiz	34
Brasil	<i>Sp.</i>	-	26

6.4.2 Caracterização genética

a) Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de colônias puras, obtidas após crescimento em meio de cultura TY (Yeast-Tryptone) e/ou DYGS (Dextrose Yeast Glucose Sucrose), durante três dias a 30°C. Posteriormente alíquotas contendo 1 mL da cultura foram transferidas para microtubos, seguindo de centrifugação a 12000 rpm por 3 min, sendo os pellets formados utilizados para extração do DNA. Para extração de DNA utilizou-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Cada DNA extraído foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (1.0 %), durante 90 minutos a 75 Volts, preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). As amostras foram aplicadas no gel sendo misturado 2 µL de tampão tipo Loading (2x) (concentração inicial 10x) e 2 µL de DNA extraído. O gel foi corado com brometo de etídio. (0,5 µg. mL⁻¹) e descorados em água destilada durante 60 minutos.

b) Amplificação e sequenciamento dos genes

As reações de PCR foram preparadas usando como molde o DNA extraído dos isolados do grupo em estudo, utilizando Kit Gotaq DNA polimerase (Promega). sendo utilizado dois genes codificadores: 16S rRNA e *recA*.

Para amplificação das regiões do gene 16S rRNA e *recA*, 1,0 µL de DNA cromossômico de cada cepa em estudo, foi adicionado a um mix de PCR de 25 µl (1X buffer incolor; 1,75 µM MgCl₂, 0,25 µM dNTP, 0,25 µM cada primer (16S rRNA) e 1,0 µM cada primer (*recA*), Taq DNA polimerase 1,25 U) e submetidos a etapa inicial de desnaturação de 2 min a 94°C seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 58 °C por 45 s depois a 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 5 min.

Os primers utilizados para o gene 16S rRNA foram: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3') e *recA* utilizou-se primer 63F (5'-ATCGAGCGGTCGTTCCGCAAGGG-3') e 504R (5'-TTGCGCAGCGCCTGGCTCAT -3'), (Guant et al., 2001). Os produtos de amplificações foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose (1.5 %), durante 90 minutos a 75 Volts, preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). As amostras foram aplicadas no gel sendo misturado 2 µL de tampão tipo Loading (2x) e 2 µL de DNA extraído. O gel foi corado com brometo de etídio. (0,5 µg. mL⁻¹) e descorados em água destilada durante 60 minutos

c) Sequenciamento e análises filogenéticas

Os produtos de PCR foram sequenciados com o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1 v (Applied Biosystems – ABI) em sequenciador automático de DNA ABI 3730x1 (Applied Biosystems), seguindo o manual do fabricante. As sequências foram analisadas manualmente com a ajuda do software BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica). As sequências de todos os genes foram verificadas com análises de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997). Os Alinhamentos foram gerados usando a ferramenta Muscle (Edgar, 2004). As árvores filogenéticas foram realizadas usando o software MEGA 11 (Tamura et al., 2021), as topologias calculadas utilizando o método Maximum-Likelihood (ML), (Felsenstein, 1985), sendo usado o melhor modelo indicado pelo software o Jukes-Cantor. A confiabilidade da topologia das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando o método de bootstrap com 500 pseudoreplicatas.

6.4.3 Análises genômicas

A fim de aprofundar as análises, realizou-se comparações entre 7 genomas de estirpes de *Nitrospirillum* (BR 12005, BR 11622, BR 11865, BR 11880, BR 11145 CBAmC, *N. iridis* DSM 22198^T e BR 11142^T, sequenciados e depositados no banco de dados de nucleotídeos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os valores de identidade média de nucleotídeos foram calculados utilizando o software Ortho ANI (OAT), versão 1.30, (www.ezbiocloud.net/tools/), (LEE et al., 2016) e com Blast (ANIb) ou Mummer (ANIm) obtidos usando o software online JSpeciesWS com parâmetros padrão (RICHTER et al. 2015). As distâncias genômicas também foram calculadas usando Hibridação DNA:DNA (dDDH) e intervalos de confiança (CI) utilizando a fórmula GGDC 2 (<http://ggdc.dsmz.de>) (MEIER-KOLTHOFF et al., 2022).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para este estudo as estirpes sequenciadas foram avaliadas inicialmente pela análise via Blast, tal comparação revelou que todas as estirpes estudadas pertencem ao gênero *Nitrospirillum* com identidade maior que 97% com a cepa *N. iridis* DSM 22198^T e acima de 99% com *N. amazonense* BR 11142^T, as duas cepas-tipo descritas para este gênero.

A filogenia do 16S rRNA (1320nt), Figura 13, indica a definição de 12 clados, possuindo divisões em subclados. Os clados se diferem de *N. iridis* e somente 47 estirpes compõem o ramo monofilético de *N. amazonense* BR 11142^T (similaridade entre 97 a 99%), as demais estirpes possivelmente podem ser novas espécies, uma vez que formaram clados distintos. Verificou-se também que a estirpe a BR 11145 CBAmC, a qual possui grande importância agrícola se posicionou em um grupo composto por 29 outras estirpes, sendo estas distintas de *N. amazonense*, na qual está classificado.

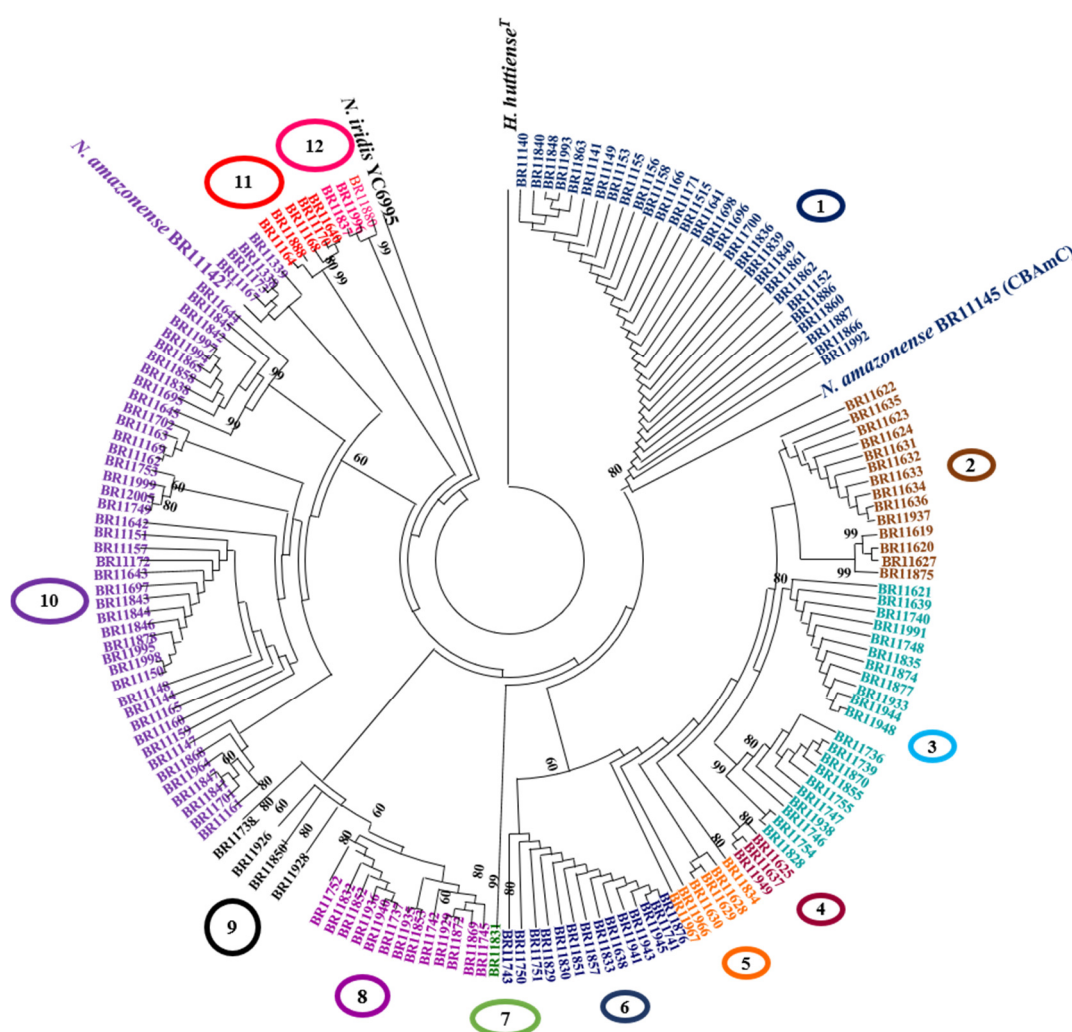


Figura 13. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança, sendo utilizado o modelo Jukes-Cantor baseada em sequências do gene 16S rRNA mostrando a posição de 162 estirpes do gênero *Nitrospirillum*. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 replica e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Como grupo externo se utilizou a *Herbaspirillum huttiense*^T. A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos.

Atualmente, o método mais confiável e aceito para determinação de espécies é a hibridação DNA-DNA, os valores de similaridade tendem a corresponder com o grau de identidade da sequência do gene 16S rRNA. É geralmente admitido que espécies com mais de 70% de similaridade de hibridação DNA-DNA possuam mais de 97 % de identidade de sequência de 16S rRNA (STACKEBRANDT et al., 1994, TORRIANI, DELLAGLIO, 2001). Embora a análise do gene 16S rRNA, seja imprescindível para obtenção de informações preliminares em estudos de taxonomia, sua filogenia não é capaz de garantir que táxons pertençam a mesma espécie. (TORRIANI, DELLAGLIO, 2001, FERREIRA et al 2020, 2022).

Para um melhor posicionamento taxonômico, uma análise filogenética do gene *recA* também foi utilizada. Tal análise permitiu uma clara distinção das estirpes de *N. amazonense*, *N. iridis* e possíveis novas espécies putativas. Na Figura 14 é possível identificar dez clados. Para os clados formados, dois são de maiores relevância, no caso: clado 8, constituído de 27 estirpes relacionadas a *N. amazonense* BR 11142^T (com similaridade de 97,60 a 99,75%) e clado 9 composto por 45 estirpes relacionadas a BR11145 CBAmC (com similaridade de 97,83 á 100%), os demais clados são possíveis novas espécies putativas (Tabela 18-Anexo).

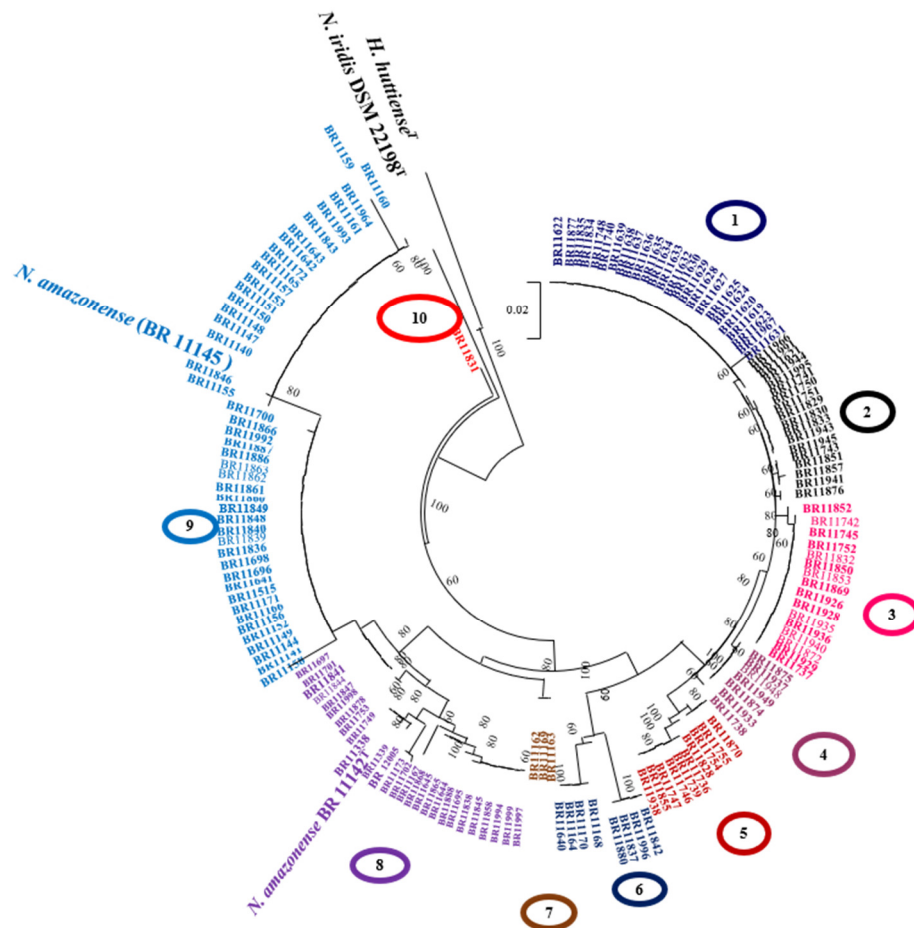


Figura 14. Árvore filogenética de Máxima verossimilhança baseada em sequências do gene *recA*, mostrando a posição de 162 estirpes de *Nitrospirillum*. em relação a estirpes tipo do gênero intimamente relacionadas. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. Como raiz se utilizou a *Herbaspirillum huttiense*^T. A barra representa uma substituição por 100 posições de nucleotídeos. Diferentes colorações representam distintos clados.

Com base nas inferências filogenética de ambos os genes, é possível identificar que existem uma grande diversidade de potenciais novas espécies dentro do gênero, sendo observado uma variação intragênica, uma vez que foram formados grupos distintos a espécies de *N. amazonense* BR 11142^T e *N. iridis* DSM 22198^T (Figura 14 e 15).

No estudo realizado por Blackwood et al., 2000 sequenciamento do gene *recA*, foi utilizado para identificação de espécie de *Mycobacterium*. Os resultados indicaram que o gene *recA*, agrega informações com menor grau de similaridade interespecies do que o sequenciamento do gene 16S rRNA. As espécies de *M. gastri* e *M. kansasii* apresentaram 96,2% de similaridade entre 96,2% entre *M. gastri* e *M. kansasii* e 75,7% entre *M. aurum* e *M. lepra*. Neste estudo as espécies *M. kansasii* de *M. gastri*, não poderiam ser discriminadas pelo gene 16S rRNA, porém foram separadas pelo uso do gene *recA*.

De forma a aprofundar a taxonomia e relação entre possíveis novas espécie de *Nitrospirillum*, oito genomas foram recuperados do banco de dados do NCBI, para análises métricas de genomas.

Tabela 15. Genomas de *Nitrospirillum* utilizado neste estudo.

Estirpes	Outras designações	Assembly	Contigs	Tamanho (Mb)	GC%	Proteínas	Referência
BR 11142	Y1	GCA_029594735.1-	92	6,87-	67,4-	6864-	(2)
BR 11140	Y2	GCA_007827975.1	73	7.48	67.3	6210	(2)
BR 11145	CBAmC	GCA_000730165.2	4	7.38	67.4	6129	(1)
BR 11622	-	GCA_007827955.1	50	6.57	67.2	5437	(2)
BR 11865	-	GCA_007828025.1	61	7.03	67.6	5887	(2)
BR 11880	-	GCA_007828045.1	82	7.09	67.6	5988	(2)
BR 12005	-	GCA_007828035.1	44	6.82	67.7	5691	(2)
<i>N. iridis</i>	DSM 22198	GCA_014205765.1	58	7.09	67.2	5859	(3)

(1) Baldani et al., 2010; (2) Embrapa CRB-JD; (2) DOE Joint Genome Institute.

Os cálculos de ANI (ANIm, ANIb e OrthoANI) indicaram valores semelhantes sendo possível verificar a divisão das cepas em *N. iridis* DSM 22198^T; *N. amazonense* BR 11142^T e novas espécies putativas. Sabendo que os valores de ANI recomendados oscilam entre (95 a 96%) e dDDH (70%) (PALMER et al., 2020; KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2007). Neste trabalho vamos seguir a mesma metodologia já realizada em nossos estudos anteriores e considerar os valores de corte definidos de ANI (96%) e dDDH (70 %) (Ferreira et al., 2020; 2022).

Os valores de ANI das linhagens BR 11140, BR 11142^T, BR 11145 (CBAmC), BR 11622, BR 11865, BR 11880 e BR 12005 em comparação com *N. iridis* linhagem DSM 22198^T foram inferiores a 87,79% e maior valor de dDDH foi 29,1% (Tabela 16), confirmando que pertencem a espécies distintas considerando o limiar de circunscrição de espécies.

Os valores dos cálculos de ANI entre as estirpes BR 11142^T e BR 12005 foi superior ao limite de circunscrição de espécie apresentando 98.89 e 92.90% respectivamente de valores de ANI e dDDH, confirmando que estas estirpes, são da mesma espécie e consequentemente também as estirpes que se agruparam com estas nas análises do *recA*, BR 11339 e BR 11338 (Figura 15). Da mesma forma, as linhagens BR 11140 e BR 11145 (CBAmC) também apresentaram valores de ANI acima de 96.01 % e dDDH de 68%; um pouco abaixo do limiar de circunscrição estabelecido de 70% para dDDH, todavia é possível considerar que essas duas cepas, conforme observado na análise filogenética do gene *recA*, constituem uma nova espécie que se difere das espécies já descritas de *N. amazonense* e *N. iridis*.

Além disso a comparação dos genomas das estirpes BR 11622, BR 11865, BR 11880 com a estirpe *N. amazonense* e *N. iridis*, mostraram diferenças abaixo do limite para diferenciação de espécies, indicando serem potenciais novas espécies.

Tabela 16. Métricas Genômicas (matrizes) de oito genomas de *Nitrospirillum*.

Análise de ANIm (JSpeciesWS)			
Estirpes	BR11142 ^T	BR 11145	<i>N. iridis</i>
BR 11142 ^T	*	94.41	87.70
BR 11140	93.85	96.41	87.79
BR 11145	94.41	*	87.77
BR 11622	89.09	89.18	87.65
BR 11865	95.17	95.42	87.76
BR 11880	93.05	93.60	87.78
BR 12005	99.20	94.40	87.73
<i>N. iridis</i>	87.70	87.77	*
Análise de ANIb (JSpeciesWS)			
Estirpes	BR11142 ^T	BR 11145	<i>N. iridis</i>
BR11142 ^T	*	93.38	84.32
BR 11140	92.70	95.71	84.44
BR11145	93.38	*	84.27
BR11622	86.38	86.57	83.76
BR11865	94.44	94.79	84.27
BR11880	91.90	92.62	84.35
BR12005	98.89	93.82	84.36
<i>N.iridis</i>	84.32	94.27	*
Estirpes	BR11142 ^T	BR 11145	<i>N. iridis</i>
BR11142 ^T	*	93.25	84.49
BR 11140	93.26	96.01	84.57
BR11145	93.25	*	84.41
BR11622	86.54	86.63	84.00
BR11865	94.79	94.98	84.42
BR11880	92.35	92.93	84.53
BR12005	99.07	93.94	84.26
<i>N.iridis</i>	84.49	84.41	84.53
Análise GGDD (dDDH)			
Estirpes	BR11142 ^T	BR 11145	<i>N. iridis</i>
BR11142 ^T	*	55.70	28.60
BR 11140	52.60	68,0	29.1
BR11145	55.70	*	28.8
BR11622	32.10	32.4	28.0
BR11865	60.10	61.5	28.8
BR11880	48.60	51.4	29
BR12005	92.90	55.6	28.7
<i>N.iridis</i>	28.60	28.8	*

Valores em negrito, dentro dos limites de circunscrição da espécie. Limiares de circunscrição da espécie, ANI (ANIm e ANIb) (96%) conforme estabelecido por Ferreira et al., 2020; 2022, dDDH (70%).

Levando em consideração o resultado da análise genômica e o gene *recA*, chega-se à conclusão que potencialmente sete grupos da Figura 15, devam representar também novas espécies putativas, ainda a serem descritas. Trabalhos futuros específicos de taxonomia devem ser realizados para evidenciar de fato a diversidade de espécies dentro do gênero *Nitrospirillum*.

6.6 CONCLUSÕES

A caracterização molecular do gene *recA*, foi complementar as informações obtidas pelo gene 16S rRNA para identificação de estirpes de *Nitrospirillum*, contidas no acervo estudado, ambas análises demonstraram a existência de grande diversidade de espécies.

A estirpe BR 11145 (CBAmC), que possui grande importância agrícola como inoculante de cana-de-açúcar, não pertence a espécie de *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T, a qual atualmente está classificada. Esta espécie e as demais estirpes relacionadas a ela, devem ser descritas e futuramente reclassificadas.

A análise molecular do gene *recA*, contribuiu efetivamente para discriminar espécie de *Nitrospirillum* de maneira rápida e sequências curtas, nossos resultados indicam que além das estirpes *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T e *Nitrospirillum iridis* DSM 22198^T, outras espécies putativas são evidentes e futuramente podem ser classificadas com maior robustez. Para uma maior classificação de estirpes desse gênero se recomenda-se análises baseadas em genomas.

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, n. 17, p. 3389-3402. 1997.
- AZEVEDO, M. S. **Influência do solo e da planta sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense*, associados às raízes de arroz, milho e sorgo.** Dissertação (Mestrado) Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1998. 110p.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An Acad Bras Ciênc.** 77:549-579. 2005.
- BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero em raízes de milho, sorgo e arroz.** Dissertação (Mestrado), Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1984. 110 p.
- BLACKWOOD, K. S.; HE, C.; GUNTON, J.; TURENNE, C. Y.; WOLFE, J.; KABANI, A. M. Evaluation of recA sequences for identification of *Mycobacterium* species. **J Clin Microbiol.** Aug;38(8):2846-52. 2000.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** v. 32, p. 1792-1797. 2004.
- FALK, E. C.; DOBEREINER, J.; JOHNSON, J. L.; KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic Acid Homology of *Azospirillum amazonense*. In: MAGALHAES **1984 and Emendation of the Description of the Genus *Azospirillum*** 35(1), 117-118. 1985.
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** Evolution. p. 783-791. 1985.
- FERREIRA, N. D. S.; CONIGLIO A.; PUENTE, M.; SANT'ANNA, F. H.; MARONICHE, G.; GARCIA, J.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; VOLPIANO, C. G.; AMBROSINI, A. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 72:5475. 2022.
- FERREIRA, N. D. S.; SANT' ANNA F. H.; REIS V. M.; AMBROSINI, A.; VOLPIANO, C. G.; ROTHBALLER, M.; SCHWAB, S.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; PEDROSA, F. O. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 70:6203-6212. 2020.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Curr Opin Microbiol** 10(5):504-509. 2007.
- LEE, I.; OUK, K. Y.; PARK, S. C.; CHUN, J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. doi: 10.1099/ijsem.0.000760. Epub Nov 9. PMID: 26585518. 2015. **Int J Syst Evol Microbiol.** Feb;66(2):1100-1103. 2016.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; SHAHINA, M.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek** 105:1149-1162. 2014.

MAGALHAES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. "A new acid-tolerant *Azospirillum* species." **An. Acad. Brasil Ci.** 55:417-430. 1983.

MAGALHÃES, F. M. M. **Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio.** Tese (Doutorado), Manaus, Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas/INPA, 1983. 89p.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; SARDÀ CARBASSE, J.; PEINADO-OLARTE, R. L.; GÖKER, M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic Acid Res** 50: D801-D807, 2022.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant Soil.** 284:23-32. 2006.

OLIVEIRA, A. L.; URQUIAGA S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil.** 242:205-215. 2002.

PALMER, M.; STEENKAMP, E. T.; BLOM, J.; HEDLUND, B. P.; VENTER, S. N. All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy published online ahead of print, [Apr 3]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2020.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 32:1139-1146. 2005.

REIS JUNIOR, F. B.; DA SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados à *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, 28: 103-113. 2004.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; GLÖCKNER, F. O.; PEPLIES, J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics.** Nov 16. pii: btv681. 2015.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização Fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e Avaliação dos Efeitos da Inoculação em Plantas de Arroz Inundado (*Oryza sativa* L.).** Seropédica-RJ. UFRRJ. Instituto de Agronomia – Depto. de Solos. 66 f. 2004.

SCHULTZ, N.; DA SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 38(2):407-414. 2014.

SCHULTZ N.; DE MORAIS, R. F.; DA SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47(2):261-268. 2012.

SCHWAB, S.; TERRA, L.; BALDANI, J. I. Genomic characterization of *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC, a nitrogen-fixing bacterium isolated from surface-sterilized sugarcane stems. **Molecular Genetics and Genomics**. 2018.

SOUTO, S. M. **Variação estacional da fixação de N₂ e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais**. (Tese de Doutorado) Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1982. 268p.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44:846-849. 1994.

TAMURA K.; STECHER G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**. 2021.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(8), 3450-3454. 2001.

7.CONCLUSÕES GERAIS

O Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner abriga uma alta variabilidade genética de espécies, que são exploradas, principalmente para o uso de insumos biológicos. O gênero *Azospirillum* e *Nitrospirillum* são gêneros bem utilizados para essa finalidade, possuindo interesse por seu potencial como promotores de crescimento vegetal, devido suas associações com plantas de importância econômica.

Neste estudo foi possível efetuar a classificação e reclassificação de estirpes depositadas desde a década de 1960 para os referidos gêneros, indicando a sua alta diversidade taxonômica. A classificação taxonômica foi baseada através de técnicas moleculares com a amplificação do gene *recA*. Essa técnica possibilitou a classificação rápida e discriminou estirpes até nível de espécie, relacionando algumas estirpes a espécies já descritas e indicando novas espécies putativas.

Novos posicionamentos taxonômicos, através de técnicas mais robustas baseadas em caracterizações bioquímicas, fenotípicas e genômicas foram obtidos, sendo possível a reclassificação e descrição de duas estirpes do gênero *Azospirillum*: *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T e *Azospirillum argentinense* Az39^T. Para o gênero *Nitrospirillum* foi possível identificar previamente que este gênero necessita ser classificado, pois novas espécies putativas são existentes e não estão relacionadas com as duas espécies descritas para este gênero.

Considerando que a taxonomia procariótica, vendo sofrendo, muitas mudanças ao longo do tempo, devido ao desenvolvimento de tecnologias novas e mais robustas. Nossos resultados possibilitaram um maior esclarecimento do posicionamento taxonômico de um vasto número de estirpes depositadas no banco de germoplasma do CRB-JD.

Futuramente espera-se uma diminuição de análises adicionais para uma caracterização e classificação bacteriana, consideramos que o uso de dados genômicos possam ser suficientes para fornecer descrições confiáveis, ganhando um status mais estável de descoberta e classificação de táxons.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ALELO MICRO CONSULTAS **Seção dados gerais (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa)**. Disponível em: <https://am.cenargen.embrapa.br/am/consulta/colecao/numeros?id=2>; 2021. Acesso em 21/10/2022.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 1;25(17):3389-402. 1997.

AUCH, A. F.; VON JAN M.; KLENK, H. P.; GÖKE, M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Stand Genomic Sci.** 2:117-134. 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* Promotes plant growth: a critical assessment. **Advances in Agronomy.** 10877-136. 2010.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics.** Dec 15; 10:421. 2009.

CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; DA COSTA, M. S.; ROONEY, A. P.; YI, H.; XU, X. W.; DE MEYER, S.; TRUJILLO, M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **Int J Syst Evol Microbiol.** 68(1):461-466. 2018.

CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. **Int J Syst Evol Microbiol.** 64:316-324. 2014.

DE LAJUDIE, P. M.; YOUNG, J. P. W. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of rhizobia and agrobacteria Minutes of the closed meeting, Granada, 4 September 2017. **Int J Syst Evol Microbiol.** Oct. 68(10):3363-3368. 2018.

DE LAJUDIE, P. M.; ANDREWS, M.; ARDLEY, J.; EARDLY, B.; JUMAS-BILAK, E.; KUZMANOVIĆ, N. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. **Int J Syst Evol Microbiol.** Jul. 69(7):1852-1863. 2019.

10

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **Int J Syst Evol Microbiol.** 57:81-91. 2007.

SANT'ANNA, F. H.; BACH, E.; PORTO, R. Z.; GUELLA, F.; HAYASHI SANT'ANNA, E.; PASSAGLIA, L. M. P. Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy. **Critical Reviews in Microbiology** 1-19. 2019.

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

HUNGRIA, M.; MENDES, I.; MERCADANTE, F. M. Tecnologia de fixação biológica de nitrogênio com o feijoeiro: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas. **Documentos** nº. 338. Londrina: Embrapa Soja. 2013.

K€AMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited. **Environ. Microbiol.** 14:291-317. 2012.

KLENK, H. P.; GOKER, M. En route to a genome-based classification of Archaea and Bacteria? **Systematic and Applied Microbiology** v. 33, p. 175-182. 2010.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proc Natl Acad Sci USA.** 102:2567-2572. 2005.

KURTZ, S.; PHILLIPPY, A.; DELCHER, A. L.; SMOOT, M.; SHUMWAY, M.; ANTONESCU, C.; SALZBERG, S. L. Versatile and open software for comparing large genomes. **Genome Biol.** 5(2):R12. 2004.

LABEDA, D.P.; DOROGHAZI, J. R.; JU, K. S.; METCALF, W. W. Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 64, p. 894-900. 2014.

LEE, I.; OUK KIM, Y.; PARK, S. C.; CHUN, J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **Int J Syst Evol Microbiol** 66:1100-1103. 2016.

LI, X.; HUANG, Y.; WHITMAN, W. B. The relationship of the whole genome sequence identity to DNA hybridization varies between genera of prokaryotes. **Antonie Van Leeuwenhoek** 107, 241-249. 2015.

MCCARTHY, B. J.; BOLTON, E. T. An approach to the measurement of genetic relatedness among organisms. **Proc Natl Acad Sci USA** 50:156-164. 1963.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H. P. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics** 14, 60. 2013.

PALMER, M.; STEENKAMP, E. T.; BLOM, J.; HEDLUND, B. P.; VENTER, S. N. All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy published online ahead of print, **Int J Syst Evol Microbiol** [Apr 3]. 2020.

RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights** v. 2, p. 51-69. 2009.

SAATH, K. C.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural** 56 (2), 195-212. 2018.

YOON, S. H.; HÁ, S. M.; LIM, J.; KWON, S.; CHUN, J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie Van Leeuwenhoek** 110:1281-1286. 2017.

9. ANEXOS

Tabela 17. Características de depósito de *Azospirillum* spp e percentual de similaridade de nucleotídeos do gene *recA*, entre algumas estirpes tipo do gênero *Azospirillum*. *A. baldaniorum* Sp245^T; *A. argentinense* Az39^T; *A. brasilense* Sp7^T; *A. lipoferum* Sp59b^T; *A. palustre* B2^T; 6- *A. mellinis* TMCY 552^T.

Classificação CRB-JD	Estirpe	Data de Coleta	Substrato	Hospedeiro	País	Sp245 ^T	Az39 ^T	Sp7 ^T	59b ^T	B2 ^T	TMCY 552 ^T
<i>A. brasilense</i>	BR11004	01/03/1978	Solo	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	98,63	97,78	97,23	89,90	90,22	91,80
<i>A. brasilense</i>	BR11006	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	98,63	97,78	97,23	89,90	90,22	91,80
<i>A. brasilense</i>	BR11007	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11008	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11009	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	100,00	96,24	96,84	88,55	89,20	90,24
<i>A. brasilense</i>	BR11010	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	98,62	94,90	95,50	86,98	87,63	88,97
<i>A. brasilense</i>	BR11016	01/07/1980	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11012	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	98,34	94,61	95,22	86,67	87,31	88,66
<i>A. brasilense</i>	BR11013	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11014	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11020	01/07/1980	-	-	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11021	01/03/1978	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11022	01/03/1978	Raiz	<i>Oryza sativa</i>	Brasil	98,63	97,78	97,23	89,90	90,22	91,80
<i>A. brasilense</i>	BR11032	01/04/1978	Rizosfera	<i>Triticum aestivum</i>	Argentina	98,07	97,21	96,67	89,28	89,60	91,20
<i>A. brasilense</i>	BR11035	01/04/1978	Rizosfera	<i>Triticum aestivum</i>	Argentina	98,07	97,21	96,67	89,28	89,60	91,20
<i>A. brasilense</i>	BR11024	01/03/1978	Raiz	<i>Oryza sativa</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11036	01/04/1978	Rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	Argentina	98,07	97,21	96,67	89,28	89,60	91,20
<i>A. brasilense</i>	BR11037	01/04/1978	Rizosfera	<i>Triticum aestivum</i>	Argentina	98,07	97,21	96,67	89,28	89,60	91,20
<i>A. brasilense</i>	BR11051	01/07/1980	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11052	01/07/1980	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11054	01/07/1980	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	99,45	95,79	96,38	87,99	88,63	89,95
<i>A. brasilense</i>	BR11059	01/03/1978	Raiz	<i>Zea mays L</i>	-	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11053	01/07/1980	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11064	01/07/1980	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	100,00	96,36	96,95	88,65	89,28	90,58
<i>A. brasilense</i>	BR11516	01/03/1978	Raiz	<i>Ananas comosus</i>	Alemanha	97,79	97,77	97,51	88,94	90,20	91,48

Continua...

Continuação da Tabela 17.

Classificação CRB-JD	Estirpe	Data de Coleta	Substrato	Hospedeiro	País	Sp245 ^T	Az39 ^T	Sp7 ^T	59b ^T	B2 ^T	TMCY 552 ^T
<i>A. lipoferum</i>	BR11646	01/08/1974	Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	97,79	97,77	97,51	88,94	90,20	91,48
<i>A. brasilense</i>	BR11884	03/08/1999	Rizosfera	<i>Brachiaria decumbens</i>	Brasil	96,81	97,43	96,47	88,22	88,92	90,44
<i>A. brasilense</i>	BR11890	02/02/1999	Rizosfera	<i>Brachiaria decumbens</i>	Brasil	97,75	96,80	96,79	88,18	88,88	90,40
<i>A. brasilense</i>	BR11893	03/08/1999	Raiz	<i>Brachiaria decumbens</i>	Brasil	97,43	96,81	96,47	88,22	88,92	90,44
<i>A. brasilense</i>	BR11892	02/02/1999	Raiz	<i>Brachiaria brizantha</i>	Brasil	97,23	96,36	96,94	88,94	89,88	91,48
<i>A. brasilense</i>	BR11891	02/02/1999	Raiz	<i>Brachiaria decumbens</i>	Brasil	96,81	97,23	96,47	88,22	88,92	90,44
<i>A. lipoferum</i>	BR11982	08/01/2001	-	<i>Zea mays L.</i>	-	97,49	97,23	96,94	88,94	89,88	91,48
<i>A. brasilense</i>	BR12001	02/02/1999	Raiz	<i>Brachiaria decumbens</i>	Brasil	97,49	97,23	96,94	88,94	89,88	91,48
<i>A. brasilense</i>	BR11025	01/03/1978	Raiz -	<i>Oryza sativa</i>	Argentina	96,66	98,06	96,94	88,27	89,57	91,18
<i>A. brasilense</i>	BR11038	01/04/1978	Rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	Argentina	96,66	98,06	96,94	88,27	89,57	91,18
<i>A. brasilense</i>	BR11072	01/05/1979	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	96,36	100,0	97,22	88,93	90,53	91,49
<i>A. brasilense</i>	BR10884	01/02/1975	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	96,65	99,73	97,50	89,24	90,84	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR10886	01/02/1977	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Nigéria	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11
<i>A. brasilense</i>	BR11039	01/04/1978	Rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	México	96,65	99,17	97,50	89,25	90,85	91,80
<i>A. brasilense</i>	BR11040	01/04/1978	Rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	México	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11041	01/04/1978	Rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	México	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11056	01/02/1978	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Argentina	96,65	99,17	97,50	89,25	90,85	91,80
<i>A. brasilense</i>	BR11066	-	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11070	01/05/1979	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11055	01/02/1978	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Argentina	96,65	99,17	97,50	89,25	90,85	91,80
<i>A. brasilense</i>	BR11065	-	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11067	-	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11068	-	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. lipoferum</i>	BR11082	-	Solo	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11
<i>A. lipoferum</i>	BR11089	01/12/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11
<i>A. lipoferum</i>	BR11090	01/12/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11
<i>A. lipoferum</i>	BR11139	01/06/1981	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11
<i>A. lipoferum</i>	BR11138	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11
<i>A. brasilense</i>	BR11609	10/01/2000	Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	95,81	97,50	97,50	89,94	90,52	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11669	08/01/2001	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	96,08	97,77	97,21	89,57	90,83	91,79
<i>sp.</i>	BR11795	01/05/1999	Raiz	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	96,65	99,17	97,50	89,25	90,85	91,80
<i>A. lipoferum</i>	BR11650	10/01/1975	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11

Continua...

Continuação da Tabela 17.

Classificação CRB-JD	Estirpe	Data de Coleta	Substrato	Hospedeiro	País	Sp245 ^T	Az39 ^T	Sp7 ^T	59b ^T	B2 ^T	TMCY 552 ^T
<i>A. brasilense</i>	BR11658	10/01/2000	Raiz	<i>Brachiaria sp.</i>	Brasil	96,94	99,45	97,78	89,57	91,17	92,11
<i>A. brasilense</i>	BR11659	10/01/2000	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,08	97,77	97,21	89,57	90,83	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11975	04/01/1988	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,08	97,77	97,21	89,57	90,83	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11973	04/01/1988	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,08	97,77	97,21	89,57	90,83	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11977	04/01/1988	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,08	97,77	97,21	89,57	90,83	91,79
<i>A. brasilense</i>	BR11978	04/01/1988	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	96,65	99,18	97,50	89,57	91,17	92,11
<i>A. lipoferum</i>	BR11990	02/07/2001	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	95,79	97,74	96,77	89,29	90,36	91,14
<i>A. brasilense</i>	BR12242	02/05/2005	Raiz	<i>Fragaria sp.</i>	Argentina	96,56	99,39	97,52	89,28	90,71	91,44
<i>A. brasilense</i>	BR11019	01/01/1987	Raiz	<i>Dactylis glomerata</i>	Rússia	94,05	95,18	98,78	87,36	88,27	89,58
<i>A. lipoferum</i>	BR 11017	01/01/1987	Raiz	<i>Sorghum vulgare</i>	Rússia	89,59	90,84	99,73	94,26	91,13	95,75
<i>A. brasilense</i>	BR11061	01/03/1978	Raiz	<i>Dioscorea sp.</i>	Brasil	96,26	96,54	98,29	87,55	89,19	89,94
<i>A. brasilense</i>	BR11796	01/11/2001	Raiz	<i>Brachiaria humidicola</i>	Brasil	95,78	96,35	97,77	88,91	90,49	91,49
<i>A. brasilense</i>	BR10887	-	Solo	-	Algeria	96,95	97,22	100,00	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11002	01/01/1976	Solo	<i>Cynodon dactylon</i>	EUA	96,95	97,22	100,00	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11003	01/01/1980	Raiz	<i>Triticum sp.</i>	Brasil	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11015	01/01/1976	Raiz	<i>Cynodon dactylon</i>	Alemanha	96,95	97,22	100,00	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11027	01/03/1978	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Argentina	96,95	97,22	100,00	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11042	01/01/1980	Raiz	<i>Triticum sp</i>	Brasil	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11045	01/07/1980	Raiz	<i>Triticum sp</i>	Brasil	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11046	01/07/1980	Raiz	<i>Triticum sp</i>	Brasil	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11048	01/07/1948	Raiz	<i>Triticum sp</i>	Brasil	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11050	01/07/1980	Raiz	<i>Triticum sp</i>	Brasil	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11058	01/02/1978	Raiz	<i>Digitaria decumbens</i>	Itália	96,95	97,22	100,00	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11069	01/04/1978	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11075	01/03/1983	Raiz	<i>Digitaria decumbens</i>	México	96,95	97,22	100,00	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11057	01/02/1978	Raiz	<i>Digitaria decumbens</i>	Itália	96,95	97,22	100,00	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11603	01/03/1995	Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	96,66	97,21	98,34	90,20	91,11	92,06
<i>A. brasilense</i>	BR11607	07/07/1986	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,66	96,92	98,62	88,33	89,23	90,23
<i>A. lipoferum</i>	BR11649	01/09/1974	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,37	96,65	99,45	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11657	10/01/2000	Raiz	<i>Brachiaria sp.</i>	Brasil	96,66	96,93	99,73	89,27	91,15	91,48
<i>A. brasilense</i>	BR11704	08/01/2001	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,37	96,65	99,45	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11660	08/01/2001	Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	96,08	96,06	98,90	89,28	90,18	90,84

Continua...

Continuação da Tabela 17.

Classificação CRB-JD	Estirpe	Data de Coleta	Substrato	Hospedeiro	País	Sp245 ^T	Az39 ^T	Sp7 ^T	59b ^T	B2 ^T	TMCY 552 ^T
<i>A. brasilense</i>	BR11970		Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	97,12	97,43	98,41	87,06	88,93	89,72
<i>A. brasilense</i>	BR12384		Raiz	<i>Pennisetum purpureum</i>	Brasil	96,66	96,93	99,73	88,61	90,51	90,85
<i>A. brasilense</i>	BR12374		Raiz	<i>Pennisetum purpureum</i>	Brasil	96,66	96,93	99,73	88,61	90,51	90,85
<i>A. brasilense</i>	BR11503		Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	96,94	97,78	98,90	88,27	90,52	90,86
<i>A. brasilense</i>	BR11667		Raiz	<i>Brachiaria sp.</i>	Brasil	96,37	96,65	99,45	88,94	90,83	91,16
<i>A. brasilense</i>	BR11668		Raiz	<i>Brachiaria sp.</i>	Brasil	96,66	96,93	99,73	89,27	91,15	91,48
<i>A. brasilense</i>	BR11062		Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	92,53	94,30	94,02	87,74	89,33	89,97
<i>A. lipoferum</i>	BR11084		Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	95,51	95,21	96,65	88,97	90,79	91,15
<i>A. brasilense</i>	BR11018		Raiz	<i>Festuca pratensis</i>	Rússia	94,05	95,18	95,78	87,36	88,27	89,58
<i>A. brasilense</i>	BR11074		Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	90,51	89,83	91,12	91,26	90,87	92,44
<i>A. lipoferum</i>	BR11103		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,87	90,81	92,39	91,88	92,14	93,05
<i>A. lipoferum</i>	BR 11722		Raiz	<i>Brachiaria sp.</i>	Brasil	89,96	91,50	90,57	93,07	92,76	94,29
<i>A. lipoferum</i>	BR 11085		Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	87,85	88,51	88,81	92,68	98,75	93,63
<i>A. lipoferum</i>	BR 11976		Raiz	<i>Zea may L.</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11656		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11116		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11110		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11107		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11104		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	88,94	90,20	90,50	93,66	99,18	95,76
<i>A. lipoferum</i>	BR 11101		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11100		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11031		Rizosfera	<i>Zea mays L.</i>	Argentina	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11023		Raiz	<i>Oryza sativa</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11044		Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	94,26	99,73	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11078		Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	89,28	90,53	90,83	93,97	100,00	95,46
<i>A. lipoferum</i>	BR 11647		Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	93,68	99,18	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11648		Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	89,59	90,84	91,13	93,68	99,18	95,75
<i>A. lipoferum</i>	BR 11405		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,60	90,21	90,51	93,68	99,17	95,44
<i>A. lipoferum</i>	BR 11502		Folha	<i>Ananas comosus</i>	Brasil	89,28	90,53	90,83	93,97	100,00	95,46
<i>A. lipoferum</i>	BR11083		Solo	<i>Sorghum vulgare</i>	Brasil	90,91	92,11	92,11	93,38	94,25	95,17
<i>A. lipoferum</i>	BR11112		Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,63	91,82	92,45	94,85	94,24	97,19
<i>A. lipoferum</i>	BR11618		Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	90,91	92,11	92,11	93,38	94,25	95,17

Continua...

Continuação da Tabela 17.

Classificação CRB-JD	Estirpe	Data de Coleta	Substrato	Hospedeiro	País	Sp245 ^T	Az39 ^T	Sp7 ^T	59b ^T	B2 ^T	TMCY 552 ^T
<i>A. lipoferum</i>	BR11614	07/07/1986	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	90,91	92,11	92,11	93,38	94,25	95,17
<i>A. lipoferum</i>	BR11092	01/12/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,30	92,46	91,22	93,75	93,98	95,78
<i>A. brasiliense</i>	BR12351	01/03/2009	Raiz	<i>Pennisetum purpureum</i>	Brasil	91,23	93,65	92,44	93,68	93,61	95,45
<i>A. brasiliense</i>	BR12186	07/04/1997	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	90,30	92,46	91,22	93,75	93,98	95,78
<i>A. lipoferum</i>	BR11664	10/01/2000	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	90,08	92,35	91,06	94,02	94,26	95,86
<i>A. lipoferum</i>	BR11612	10/01/2000	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	90,61	92,75	91,53	94,62	93,68	96,07
<i>A. lipoferum</i>	BR11500	01/03/1995	Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	90,30	91,81	92,44	95,19	93,69	96,35
<i>A. lipoferum</i>	BR11616	10/01/2000	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	90,30	91,81	92,44	95,19	93,69	96,35
<i>A. brasiliense</i>	BR11047	01/07/1980	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,63	91,82	92,45	94,85	94,24	97,19
<i>A. lipoferum</i>	BR11088	01/02/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,26	91,80	92,11	94,85	95,14	96,33
<i>A. lipoferum</i>	BR11094	01/10/1990	Raiz	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brasil	90,95	92,14	92,77	93,98	93,96	96,92
<i>A. lipoferum</i>	BR11095	01/10/1990	Raiz	<i>Zea mays L</i>	Brasil	90,95	92,14	92,77	93,98	93,96	96,92
<i>A. lipoferum</i>	BR11111	10/12/1991	Raiz	<i>Saccharum officinarum</i>	Brasil	89,00	90,20	91,16	93,71	93,97	95,18
<i>A. lipoferum</i>	BR11406	01/02/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,63	91,82	92,45	94,85	94,24	97,19
<i>A. lipoferum</i>	BR11407	01/02/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,63	91,82	92,45	94,85	94,24	97,19
<i>A. lipoferum</i>	BR11499	01/03/1995	Raiz	<i>Musa sp.</i>	Brasil	90,63	91,82	92,45	94,85	94,24	97,19
<i>A. lipoferum</i>	BR11410	01/02/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,60	91,80	92,43	94,83	94,22	97,19
<i>A. lipoferum</i>	BR11678	10/01/200	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	90,30	91,83	92,13	94,23	95,13	96,32
<i>A. lipoferum</i>	BR11666	10/01/2000	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	90,30	91,83	92,13	94,23	95,13	96,32
<i>A. lipoferum</i>	BR11112	10/12/1991	Raiz	<i>Saccharum officinarum</i>	Brasil	90,63	91,82	92,45	94,85	94,24	97,19
<i>A. brasiliense</i>	BR11063	01/07/1978	-	-	Brasil	92,15	92,71	92,72	95,21	95,18	98,06
<i>A. lipoferum</i>	BR 11661	10/01/2000	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	88,33	89,58	89,25	94,03	94,29	95,77
<i>A. lipoferum</i>	BR 11988	08/01/2001	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	88,33	89,58	89,25	94,03	94,29	95,77
<i>A. lipoferum</i>	BR 11501	01/03/1975	Folha	<i>Musa sp.</i>	Brasil	89,88	90,51	91,42	94,92	94,88	96,63
<i>A. lipoferum</i>	BR 11617	07/07/1986	Raiz	<i>Zea may L</i>	Brasil	90,90	90,25	90,90	94,60	93,70	95,79
<i>A. lipoferum</i>	BR 11133	-	Raiz	<i>Miscanthus sp.</i>	Alemanha	89,64	90,89	91,18	92,47	97,77	94,26
<i>A. lipoferum</i>	BR 11134	-	Raiz	<i>Miscanthus sp.</i>	Alemanha	89,64	90,89	91,18	92,47	97,77	94,26
<i>A. lipoferum</i>	BR 11119	01/12/1975	Raiz	<i>Miscanthus sp.</i>	Alemanha	89,64	90,89	91,18	92,47	97,77	94,26
<i>A. lipoferum</i>	BR 11122	-	Raiz	<i>Miscanthus sp.</i>	Alemanha	89,52	90,78	91,07	92,39	97,75	94,19
<i>A. brasiliense</i>	BR12350	01/03/2009	-	<i>Pennisetum purpureum</i>		90,90	92,73	91,82	94,02	94,25	96,05
<i>A. lipoferum</i>	BR 11121	01/12/1975	Raiz	<i>Miscanthus sp.</i>	Alemanha	90,62	92,20	91,87	95,03	95,32	98,58
<i>A. lipoferum</i>	BR 11120	01/12/1975	Raiz	<i>Miscanthus sp.</i>	Alemanha	90,87	92,40	92,08	94,86	95,15	98,61
<i>A. lipoferum</i>	BR 11126	-	Raiz	<i>Miscanthus sp.</i>	Alemanha	90,29	92,42	91,50	94,30	94,59	98,06

Continua...

Continuação da Tabela 17.

Classificação CRB-JD	Estirpe	Data de Coleta	Substrato	Hospedeiro	País	Sp245 ^T	Az39 ^T	Sp7 ^T	59b ^T	B2 ^T	TMCY 552 ^T
<i>A. lipoferum</i>	BR 11077	01/05/1979	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	México	90,58	91,49	91,16	95,47	95,46	100,00
<i>sp.</i>	BR 11885	02/11/1999	Rizosfera	<i>Brachiaria decumbens</i>	Brasil	90,28	91,19	90,86	95,18	95,17	99,73
<i>A. brasilense</i>	BR 11895	01/05/1999	Raiz	<i>Brachiaria humidicola</i>	Brasil	90,28	91,19	90,86	95,18	95,17	99,73
<i>A. lipoferum</i>	BR 11505	01/03/1995	Raiz	<i>Ananas comosus</i>	Brasil	90,58	91,49	91,16	95,47	95,46	100,00
<i>A. lipoferum</i>	BR 11117	01/12/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	89,90	90,88	90,53	95,15	95,15	99,71
<i>A. lipoferum</i>	BR 11114	10/12/1991	Raiz	<i>Saccharum officinarum</i>	Brasil	90,28	91,19	90,86	95,18	95,17	99,73
<i>A. lipoferum</i>	BR 11098	01/12/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,58	91,49	91,16	95,47	95,46	100,00
<i>A. lipoferum</i>	BR 11091	01/12/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,28	91,19	90,86	95,18	95,17	99,73
<i>A. lipoferum</i>	BR 11093	01/10/1990	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	90,90	91,80	91,48	95,76	95,75	99,73
<i>sp.</i>	BR 11409	01/02/1975	Raiz	<i>Triticum aestivum</i>	Brasil	90,91	91,81	91,49	95,46	95,46	99,45
<i>A. lipoferum</i>	BR 11610	10/01/2000	-	<i>Zea mays L.</i>	-	90,90	91,80	91,48	95,76	95,75	99,73
<i>A. lipoferum</i>	BR 11081	01/12/1974	Solo	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	90,28	91,19	90,86	95,18	95,75	99,18
<i>A. lipoferum</i>	BR 11615	19/04/2001	Raiz	<i>Zea mays L.</i>	Brasil	90,60	91,50	91,18	95,19	95,18	99,18

Tabela 18. Características das cepas pertencentes estudo depositadas como *Nitrospirillum* até a data de Julho/2018 e Percentual de similaridade de nucleotídeos dos gene *recA*, entre estirpes tipo do gênero *N. iridis* e *N. amazonense* BR 11142^T e BR 11145^T CBAmC.

Código	Data coleta	Substrato	País	Estado	Município	Hospedeiro	BR11142 ^T <i>N. amazonense</i>	BR11145 (CBAmC)	DSM_22198 <i>N. iridis</i>
BR 11140	01/06/1981	Raiz	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Hyparrhenia rufa</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11141	01/06/1981	Raiz	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Pennisetum purpureum</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11144	01/06/1993	Raiz	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11145	01/03/1996	Ramo/Colmo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Saccharum officinarum</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11147	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11148	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11149	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11150	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11151	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11152	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11153	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11155	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	96,79	100,00	92,28
BR 11156	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	96,78	98,44	91,62

Continua...

Continuação Tabela 18

Código	Data coleta	Substrato	País	Estado	Município	Hospedeiro	BR11142 ^T N. <i>amazonense</i>	BR11145 (CBAmC)	DSM_22198 <i>N. iridis</i>
BR 11157	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11158	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,99	96,29	88,76
BR 11159	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,29	97,83	89,23
BR 11160	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	96,13	99,72	91,34
BR 11161	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11162	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	97,07	96,50	92,39
BR 11163	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	97,07	96,50	92,39
BR 11164	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	94,66	94,69	90,90
BR 11165	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11166	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11167	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	98,42	96,22	90,78
BR 11168	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	94,66	94,69	90,90
BR 11169	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	97,07	96,50	92,39
BR 11170	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Sorghum vulgare</i>	94,66	94,69	90,90
BR 11171	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11172	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11173	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	98,42	96,22	90,78
BR 11338	-	-	Índia	-	-	<i>Cocos nucifera</i>	100,00	96,80	92,25
BR 11339	-	-	Índia	-	-	<i>Cocos nucifera</i>	99,75	96,52	91,94
BR 11515	31/03/1995	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11619	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11620	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11621	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11622	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,94	94,97	91,91
BR 11623	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11624	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11625	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11627	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11628	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11629	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11630	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94

Continua...

Continuação da Tabela 18.

Código	Data coleta	Substrato	País	Estado	Município	Hospedeiro	BR11142 ^T N. <i>amazonense</i>	BR11145 (CBAmC)	DSM_22198 <i>N. iridis</i>
BR 11631	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	93,47	93,51	90,19
BR 11632	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11633	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11634	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11635	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11636	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11637	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11638	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11639	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11640	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	94,66	94,69	90,90
BR 11641	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	96,78	98,44	91,62
BR 11642	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	96,80	100,00	92,30
BR 11643	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	96,80	100,00	92,30
BR 11644	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	98,70	96,48	92,15
BR 11645	01/06/1981	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays</i> L.	98,70	96,48	92,15
BR 11695	01/08/1998	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,44	96,20	92,46
BR 11696	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11697	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,71	96,71	92,56
BR 11698	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11700	01/03/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	96,42	98,28	90,95
BR 11701	01/03/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,71	96,51	92,56
BR 11702	01/08/2000	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	97,63	95,35	91,50
BR 11736	23/10/2000	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica		94,37	94,99	92,67
BR 11737	13/12/2000	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica		94,91	94,95	92,00
BR 11738	13/12/2000	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica		95,54	94,99	91,95
BR 11739	14/12/2000	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás		94,37	94,99	92,67
BR 11740	15/12/2000	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica		94,95	94,98	91,94
BR 11741	13/12/2000	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás		95,24	95,27	92,25
BR 11742	06/01/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás		94,91	94,95	92,00
BR 11743	05/01/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás		94,91	94,95	91,87
BR 11745	05/01/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás		94,91	94,95	92,00

Continua...

Continuação da Tabela 18.

Código	Data coleta	Substrato	País	Estado	Município	Hospedeiro	BR11142 ^T N. <i>amazonense</i>	BR11145 (CBAmC)	DSM_22198 <i>N. iridis</i>
BR 11746	07/01/2001	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica		94,37	94,99	92,67
BR 11747	07/01/2001	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica		94,37	94,99	92,67
BR 11748	18/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	-	94,92	95,53	93,34
BR 11749	16/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás		97,90	97,35	92,14
BR 11750	17/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Zea mays</i> L.	95,24	95,27	92,25
BR 11751	18/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i> L.	95,24	95,27	92,25
BR 11752	17/03/2001	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i> L.	94,91	94,95	92,00
BR 11753	16/03/2001	Solo	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i> L.	97,90	97,35	92,14
BR 11754	18/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i> L.	94,92	95,53	93,34
BR 11755	18/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i> L.	94,92	95,53	93,34
BR 11828	17/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i> L.	94,96	95,57	93,28
BR 11829	05/01/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i> L.	95,24	95,27	92,25
BR 11830	17/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i> L.	95,24	95,27	92,25
BR 11831	19/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i> L.	96,17	94,33	93,60
BR 11832	06/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i> L.	94,91	94,95	92,00
BR 11833	16/03/2001	Solo	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i> L.	95,24	95,27	92,25
BR 11834	05/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11835	07/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i> L.	94,95	94,98	91,94
BR 11836	01/09/1998	-	Brasil	Minas Gerais	Patos de Minas	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11837	01/08/1998	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	94,91	95,02	90,10
BR 11838	01/08/1998	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,44	96,20	92,46
BR 11839	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11840	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11841	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	97,60	98,71	92,56
BR 11842	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria humidicola</i>	94,91	95,02	90,10
BR 11843	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11844	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,71	96,71	92,56
BR 11845	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria humidicola</i>	98,44	96,20	92,46
BR 11846	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,50	99,74	91,94
BR 11847	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	97,60	98,71	92,56
BR 11848	01/09/1998	-	Brasil	Minas Gerais	Patos de Minas	<i>Brachiaria arrecta</i>	96,78	98,44	91,62

Continua...

Continuação da Tabela 18.

Código	Data coleta	Substrato	País	Estado	Município	Hospedeiro	BR 11142 ^T <i>N. amazonense</i>	BR 11145 (CBAmC)	DSM_22198 <i>N. iridis</i>
BR 11849	01/09/1998	-	Brasil	Minas Gerais	Patos de Minas	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11850	06/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa L.</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11851	17/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa L.</i>	94,91	94,95	91,87
BR 11852	16/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa L.</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11853	06/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa L.</i>	94,37	94,99	92,67
BR 11855	07/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa L.</i>	94,37	94,99	92,67
BR 11857	07/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa L.</i>	96,78	96,20	92,46
BR 11858	03/08/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria humidicola</i>	98,44	94,60	91,62
BR 11860	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11861	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11862	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	94,56	98,44	91,78
BR 11863	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	98,44	98,44	92,46
BR 11865	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria humidicola</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11866	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria humidicola</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11868	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria humidicola</i>	98,70	94,95	92,00
BR 11869	18/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,92	95,53	93,34
BR 11870	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,70	96,48	92,15
BR 11872	05/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11874	07/01/2001	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i>	94,95	95,56	91,94
BR 11875	06/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,95	95,56	91,94
BR 11876	19/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	92,19
BR 11877	18/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11878	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,60	96,71	92,56
BR 11880	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria humidicola</i>	94,91	95,02	90,10
BR 11886	02/02/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11887	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11888	01/03/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria humidicola</i>	94,67	94,70	90,86
BR 11926	14/12/2000	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11928	15/12/2000	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11929	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	95,24	95,27	92,25

Continua...

Continuação da Tabela 18.

Código	Data coleta	Substrato	País	Estado	Município	Hospedeiro	BR11142 ^T <i>N. amazonense</i>	BR11145 (CBAmC)	DSM_22198 <i>N. iridis</i>
BR 11933	14/02/2000	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,94	95,55	91,91
BR 11935	15/12/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11936	23/10/2000	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11937	13/12/2000	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,95	95,56	91,94
BR 11938	14/12/2000	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,37	94,99	92,67
BR 11940	23/10/2000	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	91,87
BR 11941	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,91	94,95	92,00
BR 11943	03/01/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Oryza sativa</i>	95,24	95,27	92,25
BR 11944	19/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	95,24	95,27	92,25
BR 11945	16/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	95,24	95,27	92,25
BR 11948	19/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,95	95,56	91,94
BR 11949	19/03/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,95	95,56	91,94
BR 11964	04/01/1988	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11966	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11967	08/01/2001	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Zea mays L.</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11991	04/01/1988	-	Brasil	Rio de Janeiro	Seropédica	<i>Oryza sativa</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11992	02/11/1999	-	Brasil	Bahia	Itabela	<i>Brachiaria decumbens</i>	96,78	98,44	91,62
BR 11993	01/12/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	96,80	100,00	92,30
BR 11994	01/12/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria humidicola</i>	98,44	96,20	92,46
BR 11995	01/12/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	94,95	94,98	91,94
BR 11996	01/12/1999	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria decumbens</i>	94,91	95,02	90,10
BR 11997	01/03/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria humidicola</i>	98,44	96,20	92,46
BR 11998	01/03/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,71	97,60	92,56
BR 11999	01/03/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria brizantha</i>	98,48	94,52	91,63
BR 12005	01/03/2000	-	Brasil	Goiás	Santo Antônio de Goiás	<i>Brachiaria humidicola</i>	99,75	96,52	91,94