

GENÔMICA COMPARATIVA E DIVERSIDADE DE OPERONS  
CONTENDO GENES *nif* EM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

**KÉSIA DIAS DOS SANTOS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Julho de 2020

GENÔMICA COMPARATIVA E DIVERSIDADE DE OPERONS  
CONTENDO GENES *nif* EM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

KÉSIA DIAS DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências, da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia Vegetal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Julho de 2020

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S237

Santos, Késia Dias dos.

Genômica comparativa e diversidade de operons contendo genes nif em bactérias diazotróficas / Késia Dias dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

96 f. : il.

Bibliografia: 58 - 64.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2020.

Orientador: Thiago Motta Venancio.

1. fixação biológica de nitrogênio. 2. nitrogenase. 3. cereais. 4. operons. 5. genes nif. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

GENÔMICA COMPARATIVA E DIVERSIDADE DE *OPERONS* CONTENDO  
GENES *nif* EM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

KÉSIA DIAS DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Centro  
de Biociências e Biotecnologia, da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense, como parte das  
exigências para obtenção do título  
de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

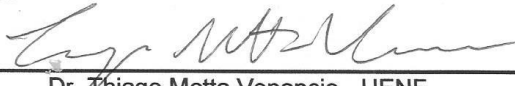
Aprovada em 28/07/2020

Comissão examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alessandro de Mello Varani - UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fábio Lopes Olivares - UENF

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Hernandez Fernandez - UENF

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Thiago Motta Venancio - UENF  
(orientador)

À Deus que foi o verdadeiro guia nessa minha jornada,  
**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelo dom maior que é viver, por suas bênçãos em minha vida e por todas as conquistas já alcançadas. Foi Ele quem me deu forças nas horas difíceis e me possibilitou chegar até aqui e conhecer pessoas muito especiais.

Ao meu irmão Ricardo, sempre presente em todos os momentos. Você é o meu ponto de referência, meu fiel e grande amigo.

Ao meu Orientador Thiago Motta Venancio, obrigada pela oportunidade, pelo exemplo de profissionalismo, apoio, ensinamentos, ajuda, confiança e pela colaboração na finalização de mais um ciclo.

Aos meus amigos e pesquisadores do laboratório. Em especial agradeço aos meus grandes amigos Dr. Kanhu Moharana, Dr. Rajesh Gazara e Francisnei Pedrosa que contribuíram diretamente com a minha pesquisa durante todo o percurso. E não menos importante, aos meus amigos Dayana Kelly, Hemanoel Passarelli, Dr. Felipe Matteoli, Fabrício Brum e Fabrício Almeida pelo companheirismo, força e incentivo. Sou muito grata pelos momentos que passamos juntos e que contribuíram direta e indiretamente para chegar até aqui.

Aos professores e pesquisadores Alessando Varani, Fabio Olivares e Jorge Fernandez por aceitarem o convite de participar da banca e contribuir com o trabalho e com o meu crescimento acadêmico;

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelo financiamento durante a pesquisa.

## RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) desempenha um papel crucial no ciclo do nitrogênio. A utilização de microrganismos promotores do crescimento vegetal em cereais é uma alternativa sustentável para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados. O fator chave da FBN é o complexo enzimático da nitrogenase, que é responsável pela redução de  $N_2$  a  $NH_4^+$  utilizando como cofator Mo, Fe ou V. A atividade da nitrogenase de Mo é a mais utilizada. Embora as propriedades bioquímicas e a estrutura das nitrogenases de Mo sejam semelhantes em diversas bactérias e arqueias, a organização e o número de genes *nif* necessários para a síntese e montagem do complexo variam entre bactérias diazotróficas. O objetivo desse trabalho foi investigar a diversidade e organização de genes *nif* em *operons* em genomas de bactérias pertencentes aos gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Nitrospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Paraburkholderia*. Foram analisados os genomas de 279 espécies de bactérias diazotróficas, dos quais foram obtidos 22 genes *nif* potencialmente envolvidos na FBN. A métrica average nucleotide identity (ANI) foi usada para inferir a similaridade entre os genomas estudados. As análises de pangenoma e filogenia foram realizadas utilizando BPGA e IQ-TREE, respectivamente. A predição de *operons* foi realizada com o servidor Operon-mapper. As análises de ANI permitiram a identificação de genomas filogeneticamente mal classificados. Os principais genes (*nifHDKENB*) se mostraram bem conservados em *operons* em todos os genomas. As cópias de genes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE* e *nifN* podem ter sido adquiridas através de transferência horizontal. Análises comparativas como as realizadas neste trabalho abrem caminho para a identificação de estruturas de *operons* selecionadas, que podem ser usadas como arcabouço para a geração de microrganismos geneticamente modificados que tenham maior rendimento na FBN.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, nitrogenase, cereais, *operons*, genes *nif*.

## ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) plays a crucial role in the nitrogen cycle. The use of microorganisms that promote plant growth in cereals is a sustainable alternative to reduce the use of nitrogen fertilizers. The key factor of BNF is nitrogenase enzyme complex, which is responsible for the reduction of  $N_2$  to  $NH_4^+$  using Mo, Fe or V as the cofactor. Mo nitrogenase activity is the most used. Although the biochemical properties and structure of Mo nitrogenases are similar in several bacteria and archaea, genomic organization and the number of *nif* genes required for synthesis and assembly of the complex vary widely among diazotrophic bacteria. The objective of this work was to investigate the diversity and organization of *nif* genes in *operons* from genomes of bacteria belonging to the genus *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Nitrospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* and *Paraburkholderia*. Genomes of 279 species of diazotrophic bacteria were analyzed and 22 *nif* genes potentially involved in BNF were obtained. The average nucleotide identity (ANI) metric was used to infer the distance between the studied genomes. Pangenome and phylogenetic analyses were performed using BPGA and IQ-TREE, respectively. Operon-mapper was used to predict the *operons*. ANI analysis allowed the identification of genomes that are likely phylogenetically misclassified. The main genes (*nif*HDKENB) have been shown to be well conserved in *operons* across genomes. Extra copies of *nif*H, *nif*D, *nif*K, *nif*E and *nif*N were likely acquired through horizontal transfer events. Our analyses open a way for the identification of selected operon structures, which can be used as a framework for the generation of genetically modified microorganisms with introduced or improved BNF genes.

Keywords: biological nitrogen fixation, nitrogenase, cereals, *operons*, *nif* genes.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral esquemática da fixação biológica de nitrogênio. Adaptado de Laranjo et al., 2014.....	19
Figura 2. Regulação do metabolismo de nitrogênio. À esquerda está ilustrada a regulação desencadeada pelo excesso de amônio. À direita regulação sob deficiência de amônio. Também são mostrados os processos regulatórios da cascata bicíclica envolvendo GlnD (UTase/UR) e GlnE (ATase/AR) que controlam a GS e o fluxo de nitrogênio pela via GS-GOGAT. Adaptado: (Bueno Batista e Dixon, 2019). .....	22
Figura 3. Organização dos agrupamentos de genes da nitrogenase Mo, V e Fe em <i>A. vinelandii</i> . Adaptado (Mus et al., 2018). .....	28
Figura 4. Análise de ANI dos 63 genomas de <i>Azospirillum</i> e <i>Nitrospirillum</i> . Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente. ....	40
Figura 5. Análise de ANI dos 7 genomas de <i>Gluconacetobacter</i> . Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente. ....	41
Figura 6. Análise de ANI entre 14 genomas de <i>Azoarcus</i> . Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente. ....	42
Figura 7. Análise de ANI entre 47 genomas de <i>Herbaspirillum</i> . Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente. ....	43
Figura 8. Análise de ANI entre 148 genomas de <i>Paraburkholderia</i> . Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente. ....	44
Figura 9. Presença e ausência de 19 genes <i>nif</i> em 63 genomas de <i>Azospirillum</i> e <i>Nitrospirillum</i> . Células vermelhas e cinzas representam a presença de <i>nif</i> <sup>HDKENB</sup> e de outros genes <i>nif</i> , enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma <i>core</i> (552 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de <i>bootstrap</i> . ....	46
Figura 10. Presença e ausência de 16 genes <i>nif</i> em 7 genomas de <i>Gluconacetobacter</i> . Células vermelhas e cinzas representam a presença de <i>nif</i> <sup>HDKENB</sup> e de outros genes <i>nif</i> , enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma <i>core</i> (1137 de genes) foi reconstruída usando o método estatístico de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de <i>bootstrap</i> . ....	47
Figura 11. Presença e ausência de 21 genes <i>nif</i> em 14 genomas de <i>Azoarcus</i> . Células vermelhas e cinzas representam a presença de <i>nif</i> <sup>HDKENB</sup> e de outros genes <i>nif</i> , enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética	

- do genoma *core* (906 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de bootstrap..... 48
- Figura 12. Presença e ausência de 16 genes *nif* em 47 espécies de *Herbaspirillum*. Células vermelhas e cinzas representam a presença de *nif*HDKENB e de outros genes *nif*, enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma *core* (443 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de *bootstrap*..... 49
- Figura 13. Presença e ausência de 18 genes *nif* em 148 espécies de *Paraburkholderia*. Células vermelhas e cinzas representam a presença de *nif*HDKENB e de outros genes *nif*, enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma *core* (558 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de *bootstrap*..... 50
- Figura 14. Comparação da topologia da árvore filogenética dos genes *nif*HDKEN com a árvore de core genoma dos gêneros em estudo. Os genomas dos gêneros com a presença dos genes *nif* estão separados pelas cores vermelho (*Azoarcus*), verde-escuro (*Gluconacetobacter*), amarelo (*Nitrospirillum*), cinza (*Azospirillum*), laranja (*Herbaspirillum*) e verde-claro (*Paraburkholderia*). Marcações na cor preta estão na árvore de gene (à direita) para representar as cópias. (\*) Árvore filogenética utilizando 7 core genes foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de bootstrap. As árvores filogenéticas dos genes foram construídas usando o método de máxima verossimilhança com o modelo de matriz LG+F+R8. Bootstrap calculado com 1.000 replicatas. .... 52
- Figura 15. *Operons nif* pertencentes aos genomas de isolados diazotróficos dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Nitrospirillum* e *Azospirillum*. .... 54
- Figura 16. *Operons nif* pertencentes aos genomas diazotróficos dos gêneros *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Paraburkholderia*. .... 55
- Figura 17. *Operons* da nitrogenase alternativa em plasmídeos de *A. brasilense*. .... 56

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos genes <i>nif</i> , suas funções e produtos. Adaptado: (Buren <i>et al.</i> , 2020). .....	24
Tabela 2. Relação dos genomas disponíveis nos bancos de dados do <i>GenBank</i> e JGI com base no gênero e quantidade de espécies. Fonte: NCBI ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ). .....	33
Tabela 3. Tabela com a presença e ausência de genes <i>nif</i> nos gêneros em estudo. ....	34
Tabela 4. Sequências de genes <i>nif</i> . Números de sequências obtidas do Uniprot, antes e após filtragem.....	38

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>ADP</b>	5' difosfato de adenosina
<b>ANI</b>	Average Nucleotide Identity (Identidade Nucleotídica Média)
<b>ATase</b>	Enzima adeniltransferase
<b>ATP</b>	5' trifosfato de adenosina
<b>BPGA</b>	Bacterial Pan Genome Analysis pipeline
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DraG</b>	Dinitrogenase reductase glicohidrolase
<b>DraT</b>	Dinitrogenase reductase ADP-ribosiltransferase
<b>FBN</b>	Fixação biológica de nitrogênio
<b>GDH</b>	Glutamato desidrogenase
<b>GlnD</b>	Adeniltransferase bifuncional
<b>GlnE</b>	Glutamina sintetase adeniltransferase bifuncional
<b>GOGAT</b>	Glutamato sintase
<b>GS</b>	Glutamina sintetase
<b>HGT</b>	Horizontal gene transfer (transferência horizontal de genes)
<b>JGI</b>	Joint Genome Institute (Instituto Genoma Conjunto)
<b>Mb</b>	Megabase
<b>ML</b>	Maximum likelihood (máxima verossimilhança)
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
<b><i>nif</i></b>	genes de fixação de nitrogênio
<b>PGPR</b>	Plant growth promoting rhizobacteria (bactéria promotora do crescimento de plantas)
<b>Pi</b>	Ponto isoelétrico
<b>RV</b>	Revolução verde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 A Revolução Verde e agricultura sustentável: desafios .....	15
1.2 Microrganismos diazotróficos e promoção do crescimento vegetal .....	16
1.3 Fixação biológica de nitrogênio.....	19
1.3.1 Controle pós-traducional da atividade da nitrogenase .....	23
1.3.2 Organização genômica da nitrogenase.....	24
1.4 Genômica comparativa .....	28
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>32</b>
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos .....	32
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
3.1 Obtenção e análises de similaridade dos genomas.....	33
3.2 Montagem do banco de dados.....	33
3.3 Comparações genômicas .....	35
3.4 Pangenoma.....	35
3.5 Análise Filogenética .....	36
3.6 Alinhamento de operons .....	36
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
4.1 Obtenção das sequências.....	37
4.2 Anotação dos genes <i>nif</i> .....	38
4.3 Genômica comparativa .....	38
4.3.1 Similaridade genômica.....	38
4.3.2 Diversidade genômica.....	45
4.3.3 Análise filogenética comparativa.....	51
4.4 Predição <i>in silico</i> da estrutura dos operons .....	52
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
<b>7. APÊNDICE</b> .....	<b>65</b>
7.1 – Genomas pertencentes ao gênero <i>Azoarcus</i> utilizados na análise. Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica.....	65

7.2 – Genomas pertencentes aos gêneros <i>Azospirillum</i> e <i>Nitrospirillum</i> utilizados na análise. Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica. ....	66
7.3 – Genomas pertencentes ao gênero <i>Gluconatobacter</i> utilizados na análise. Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica. ....	69
7.4 – Genomas pertencentes ao gênero <i>Herbaspirillum</i> utilizados na análise. Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica. ....	70
7.5 – Genomas pertencentes ao gênero <i>Paraburkholderia</i> utilizados na análise. Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica. ....	73
<b>8. REFERÊNCIAS DO APÊNDICE.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A Revolução Verde e agricultura sustentável: desafios

O balanço entre a produção de alimentos e o crescimento populacional foi pauta de grande discussão e preocupação na década de 1960. Isso porque não havia mais terras disponíveis para cultivo e o crescimento populacional aumentava exponencialmente pela diminuição da mortalidade em decorrência dos avanços da medicina e cuidados com a saúde (Bailey-Serres *et al.*, 2019). A Revolução Verde (RV), iniciada no fim da década de 1960, foi um grande passo para o aumento da produção de alimentos como trigo, milho e arroz, em grande parte pelo desenvolvimento de cultivares de alto rendimento, pela mecanização das lavouras e pela distribuição em massa de fertilizantes e pesticidas sintéticos aos agricultores (Pingali, 2012).

O nitrogênio é um dos macronutrientes mais limitantes para a produção agrícola, de maneira que a utilização de fertilizantes nitrogenados sintéticos aumentou sensivelmente a produtividade e criou grande dependência dos agricultores. No entanto, o uso massivo e indiscriminado de fertilizantes nitrogenados acarreta em danos ambientais importantes, principalmente, a contaminação de lençóis freáticos, eutrofização de sistemas aquáticos e acidificação do solo (Diaz e Rosenberg, 2008). Desta forma, muito esforços vem sendo empenhados na busca por alternativas sustentáveis para a obtenção de nitrogênio pelas plantas, particularmente por meio de engenharia genética para possibilitar que cereais estabeleçam relações simbióticas com bactérias diazotróficas, como as que naturalmente ocorrem em leguminosas ou pela criação de plantas geneticamente modificadas contendo os genes da nitrogenase (Oldroyd e Dixon, 2014; Stokstad, 2016; Burén e Rubio, 2018). Uma outra abordagem, tecnicamente mais simples e viável, é a utilização direta de bactérias promotoras do crescimento vegetal em cereais. A manipulação de bactérias diazotróficas do solo pode prover meios para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos e fornecer uma solução a curto prazo para a crise do nitrogênio (Mus *et al.*, 2016).

## 1.2 Microrganismos diazotróficos e promoção do crescimento vegetal

O nitrogênio constitui, aproximadamente, 80% da atmosfera e é um elemento essencial para a sobrevivência dos organismos, uma vez que compõe os blocos fundamentais para a construção dos ácidos nucleicos e proteínas (Döbereiner, 1997). Todavia, este macronutriente encontra-se majoritariamente na forma gasosa (N<sub>2</sub>), indisponível para absorção direta pelas plantas. Para que a assimilação vegetal de N aconteça é necessária a interação entre plantas e microrganismos. Certas bactérias, chamadas diazotróficas, são conhecidas por sua alta capacidade de fixar N<sub>2</sub> atmosférico, convertendo-o em formas assimiláveis pelas plantas, num processo denominado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (Döbereiner, 1997; Chaudhari *et al.*, 2016). As bactérias diazotróficas podem ser de vida livre, estar associadas a plantas ou, ainda, estabelecer relações simbióticas especializadas com leguminosas (Baldani *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2010).

As bactérias diazotróficas associativas são divididas em dois grupos: as facultativas e as endofíticas obrigatórias. As facultativas podem viver fora das plantas hospedeiras, colonizando tanto a rizosfera quanto o interior das raízes. Este grupo pode ser exemplificado por bactérias do gênero *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*). As endofíticas obrigatórias são estritamente dependentes da planta hospedeira para o seu crescimento e sobrevivência, colonizando apenas o interior das raízes. Este segundo grupo é exemplificado por gêneros *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus sp.* e *Paraburkholderia* (Baldani *et al.*, 1997; Döbereiner, 1997; Van Overbeek *et al.*, 2004).

Dentre as bactérias diazotróficas mais conhecidas estão várias espécies do gênero *Azospirillum*, descrito por Tarrand *et al.* (1978). Este gênero pertence a família *Rhodospirillaceae*, classe *Alphaproteobacteria*. Isolados de *Azospirillum* foram encontrados em diversos ambientes, incluindo raízes de *Leptochloa fusca*, plantas C4 (gramíneas), *Miscanthus*, capim melado (*Paspalum dilatatum*), alcatrão descartado, fontes de sulfeto, tanques de fermentação, células de combustível microbianas e solos próximos a rizosferas, regiões contaminadas por petróleo e regiões agrícolas (Lin *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019). As espécies *Azospirillum*

*amazonense* foram reclassificadas como *Nitrospirillum amazonense* com base nos dados de taxonomia polifásica e filogenia a partir da sequência de RNA ribossomal 16s (RNAr 16S) (Lin *et al.*, 2014).

O gênero *Herbaspirillum* pertencente à família *Oxalobacteraceae*, ordem *Burkholderiales* da classe beta do filo *Proteobacteria*. O gênero foi inicialmente descrito com a espécie *H. seropedicae*, que se associa preferencialmente a gramíneas de grande importância econômica e alimentar como forrageiras, trigo, milho, cana-de-açúcar, sorgo e arroz (Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1996). Das 11 espécies no gênero *Herbaspirillum*, somente *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* são capazes de realizar FBN, de se associar a plantas de importância agrícola e promover o crescimento vegetal (Monteiro *et al.*, 2012).

O gênero *Gluconacetobacter* (Yamada *et al.*, 1997) pertence à classe das  $\alpha$ -proteobactérias. É o gênero com a maior variedade de capacidades fisiológicas, como produção de ácido orgânico, FBN, síntese de polímeros de carboidratos, entre outros. Os habitats dessas espécies variam de simbiose com espécies vegetais, frutas, soluções de açúcar e etanol e até comensalismo com insetos (Velasco-Bedrán e López-Isunza, 2007).

*Azoarcus* é um gênero de betaproteobacteria pertencente à família *Rhodocyclaceae*. Este gênero foi proposto pela primeira vez por Reinhold-Hurek *et al.*, (1993) com a espécie *Azoarcus indigenis*, isolada da grama Kallar do Paquistão. Espécies de *Azoarcus* estão amplamente distribuídas em vários ambientes, incluindo caules, raízes, sedimentos de aquíferos, solo contaminado com óleo, água doce contaminada com petróleo, lodo de esgoto, solo oxidico e intestino de cupins (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1999; Reinhold-Hurek e Hurek, 2006; Chen *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2019).

O gênero *Paraburkholderia*, anteriormente classificado como sendo parte de antiga *Burkholderia*, pertence à classe  $\beta$ -proteobactéria e abrange principalmente isolados ambientais com diversos estilos de vida (Pratama *et al.*, 2018). O agrupamento filogenético validou recentemente a divisão do gênero *Burkholderia* em dois gêneros, um compreendendo majoritariamente espécies patogênicas de animais e plantas e um segundo, *Paraburkholderia*, contendo as chamadas bactérias

ambientais e não patogênicas, incluindo várias espécies promissoras do ponto de vista biotecnológico (Oren e Garrity, 2015; Bernabeu *et al.*, 2018; Pratama *et al.*, 2018).

As bactérias endofíticas vivem dentro das plantas por pelo menos parte do seu ciclo de vida e, no estágio avançado da infecção, desenvolvem uma relação de mutualismo com a planta, onde ocorre o aumento da colonização bacteriana e acesso a nutrientes, enquanto a planta hospedeira se beneficia de certas propriedades das bactérias endofíticas, que podem envolver, por exemplo, a mitigação de estresse, FBN e aumento do crescimento radicular, por exemplo. Esse mecanismo de endossimbiose leva ao conceito de “endofíticos competentes”, definidos como endofíticos que são equipados com genes importantes para a colonização e manutenção de associações planta-endofítico (Van Overbeek *et al.*, 2004; Hardoim *et al.*, 2008).

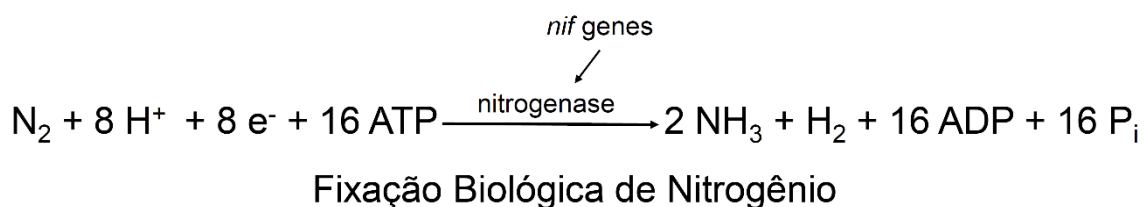
As espécies de leguminosas obtêm a maior parte de seu nitrogênio através da simbiose com a rizóbios que residem nos nódulos radiculares (Harlan, 1992; Simmonds, 2007). Algumas espécies de rizóbio isolados dos nódulos das raízes das leguminosas também são endófitos de cereais (Gutiérrez-Zamora e Martínez-Romero, 2001; Hansen *et al.*, 2017); no entanto, a maioria é incapaz de fixar nitrogênio em condições de vida livre (fora do nódulo) (Frans *et al.*, 1990; Ramachandran *et al.*, 2011). A fonte primária de carboidratos da dieta humana são provenientes de cereais (Harlan, 1992; Simmonds, 2007), como por exemplo o milho, que demanda uma alta taxa de N para seu rendimento ideal (Triplett, 1996). Portanto, um objetivo de longa data é transferir a capacidade de FBN para essas espécies, visando reduzir ou mesmo eliminar a necessidade de fertilizantes químicos nitrogenados (Triplett, 1996; Gutiérrez-Zamora e Martínez-Romero, 2001; Ryu *et al.*, 2020). A motivação da pesquisa com bactérias diazotróficas emana de sua significativa contribuição, natural ou manejada, no fornecimento de nitrogênio para as plantas de interesse agrônômico. A FBN permite a sobrevivência de plantas sob condições limitantes de nitrogênio em ecossistemas terrestres. Na agricultura, essa associação reduz a dependência de fertilizantes nitrogenados, reduzindo custos, o impacto ecológico e o consumo de

combustíveis fósseis na aplicação de fertilizantes em grande escala (Griesmann et al., 2018).

### 1.3 Fixação biológica de nitrogênio

Para que as plantas sejam capazes de assimilar N, é necessária a interação com bactérias diazotróficas, que reduzem N<sub>2</sub> a amônia (NH<sub>3</sub>) em um processo chamado de FBN, catalisado pela enzima nitrogenase, um complexo enzimático sensível ao oxigênio (CHAUDHARI; GUPTA; DUTTA, 2016; DÖBEREINER, 1997; HOFFMAN et al., 2014).

Bactérias diazotróficas possuem como fator chave da FBN o complexo enzimático da nitrogenase, que é responsável pela redução do nitrogênio atmosférico a NH<sub>3</sub>, com produção de H<sub>2</sub> (Neves *et al.*, 1993). Embora diverso, todos os microrganismos diazotróficos possuem o complexo enzimático da nitrogenase, que compartilham características comuns em relação ao mecanismo catalítico e à montagem dos cofatores (Dos Santos *et al.*, 2012; Vicente e Dean, 2017). A Figura 1 representa a equação do FBN, na qual duas moléculas de NH<sub>3</sub> são produzidas a partir de uma molécula de N<sub>2</sub>, à custa de 16 moléculas de ATP e um suprimento de elétrons e prótons (íons de hidrogênio)(Laranjo *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Visão geral esquemática da fixação biológica de nitrogênio. Adaptado de Laranjo et al., 2014.

A capacidade dos microrganismos de usar N<sub>2</sub> como única fonte de nitrogênio e de estabelecer interações com plantas hospedeiras lhes confere diversas vantagens ecológicas. No entanto, a FBN é sensível ao oxigênio e altamente dependente de energia. Este custo energético faz com que a FBN seja altamente regulada no nível transcricional através de redes regulatórias sofisticadas que respondem a múltiplos estímulos ambientais, que podem ser diferentes entre espécies e dependem da

fisiologia do hospedeiro. Além disso, importantes mudanças nas atividades das cascatas regulatórias são evidentes em organismos simbióticos na transição entre os estágios de vida livre e associativo (Dixon e Kahn, 2004; Dos Santos *et al.*, 2012). Acredita-se que a nitrogenase se originou em arqueias metanogênicas e foi transferida horizontalmente para bactérias anaeróbias e aeróbicas facultativas (Boyd *et al.*, 2011).

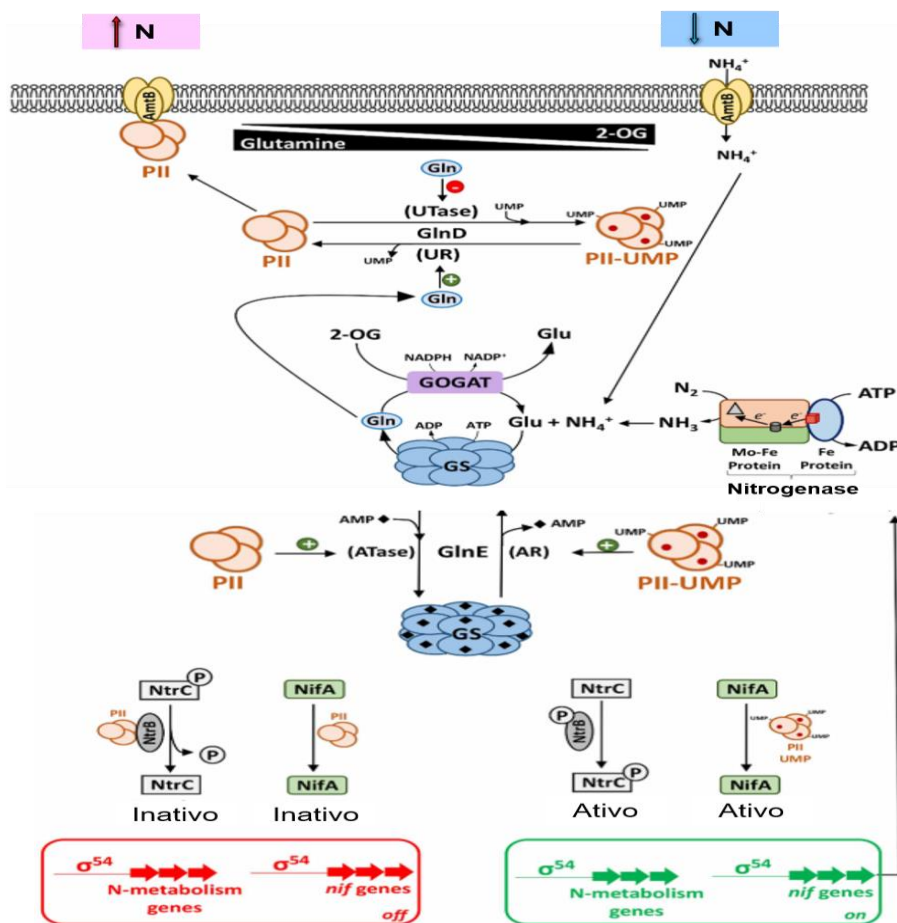
A fixação e assimilação de  $N_2$  são processos acoplados e controlados por uma complexa rede regulatória que permite que o  $N_2$  fixado seja assimilado ao invés de excretado. Os componentes dessa regulação são comuns em muitas proteobactérias e incluem proteínas PII de transdução de sinal (GlnB e GlnK), enzimas que realizam modificações pós-traducionais reversíveis de proteínas em função do controle metabólico (GlnD e GlnE) e dois sistemas de componentes regulatórios (NtrB ou NRII e NtrC ou NRI) que controlam a expressão de muitos genes do metabolismo de nitrogênio (Merrick e Edwards, 1995).

Aproximadamente 50% dos genes presentes em procariotos são organizados em estruturas *operons* (Price *et al.*, 2006; Grazziotin *et al.*, 2015), que são grupos de genes funcionalmente relacionados, regulados por um mesmo operador e transcritos em RNAs policistrônicos (Salgado *et al.*, 2000). No *operon* também estão inseridas sequências regulatórias que controlam a sua expressão (Lathe Iii *et al.*, 2000). A disposição em *operons* reduz a quantidade de informação regulatória necessária para a transcrição, tornando mais vantajosa a conservação destas estruturas ao invés da existência de promotores distintos em genes que devem ser co-regulados (Price *et al.*, 2006; Grazziotin *et al.*, 2015). Entretanto, há muitas variações nos conjuntos de genes e sua organização, em parte devido a: (i) rearranjos genômicos; (ii) a perda genética específica de linhagem (precedida ou não por duplicações gênicas) e (iii) a transferência horizontal de genes (Coenye e Vandamme, 2005).

Em Proteobactérias diazotróficas, a regulação transcricional dos genes *nif* (“*nitrogen fixation*”) é controlada em resposta à concentração externa de oxigênio refletindo no nível da expressão da nitrogenase (Dixon e Kahn, 2004). O amônio gasoso ( $NH_4^+$ ) que atravessa passivamente a membrana celular bacteriana, sob condições de fixação de nitrogênio, pode ser recuperada pelo transportador de amônia de alta afinidade (AmtB) (Wacker *et al.*, 2014).

O *status* do nitrogênio é detectado principalmente pelas proteínas triméricas de transdução de sinal PII, capazes de integrar diferentes sinais metabólicos como os níveis de glutamina, ADP, ATP e 2-oxoglutarato para controlar a fixação e a assimilação de nitrogênio (Merrick e Edwards, 1995; Huergo *et al.*, 2013). A ligação do 2-oxoglutarato fornece uma leitura do *status* de nitrogênio e carbono para regular a atividade de PII. O 2-oxoglutarato é um metabólito importante de sinalização nesse contexto, uma vez que se encontra na interface do metabolismo do carbono e do nitrogênio (Huergo e Dixon, 2015). Além disso, as proteínas PII estão sujeitas a modificações pós-traducionais pela enzima GlnD (removedora de uridililtransferase / uridilil - UTase / UR), que pode adicionar grupos uridilil aos PII ou removê-los do PII-UMP, dependendo do status do nitrogênio e modulando assim a interação das proteínas PII com seus alvos (Jiang *et al.*, 1998). Sob condições suficientes de  $\text{NH}_4^+$  ( $\uparrow\text{N}$ ) com altos níveis de glutamina, ocorre a estimulação da atividade de remoção de uridilil da GlnD, resultando na desuridiliação de PII (Figura 2). A forma não uridilada da proteína PII GlnK interage com o transportador de  $\text{NH}_4^+$ , AmtB, para inibir a captação de amônio enquanto o GlnB não modificado interage com o NtrB para estimular a desfosforilação do NtrC (Figura 2), resultando na repressão de vários genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio (Switzer *et al.*, 2018).

Sob condições limitantes de  $\text{NH}_4^+$  ( $\downarrow\text{N}$ ), quando os níveis de glutamina são baixos, a GlnD uridilila as proteínas PII modificando suas respostas-alvo de saída. As PII totalmente uridilada (PII-UMP<sub>3</sub>) não interagem com AmtB e NtrB, fazendo com que estas promovam a absorção de amônio e a fosforilação de NtrC, respectivamente (Figura 2). O NtrC fosforilado (NtrC-P) ativa a expressão de genes dependentes de  $\sigma^{54}$ , importantes para o metabolismo do nitrogênio (Van Heeswijk *et al.*, 2013).



**Figura 1. Regulação do metabolismo de nitrogênio.** À esquerda está ilustrada a regulação desencadeada pelo excesso de amônio. À direita regulação sob deficiência de amônio. Também são mostrados os processos regulatórios da cascata bicíclica envolvendo GlnD (UTase/UR) e GlnE (ATase/AR) que controlam a GS e o fluxo de nitrogênio pela via GS-GOGAT. Adaptado: (Bueno Batista e Dixon, 2019).

A assimilação de nitrogênio acontece tipicamente por meio da síntese de glutamato a partir de  $\text{NH}_4^+$  e 2-oxoglutarato, que pode ser catalisada por duas vias alternativas, da enzima glutamato desidrogenase (GDH) ou da GS-GOGAT, que combina as atividades da enzima glutamina sintase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (Van Heeswijk *et al.*, 2013). O complexo GDH catalisa a redução de 2-oxoglutarato em glutamato com o uso de um NADPH, gerando duas moléculas de glutamato. Tal via é preponderante durante o crescimento em condições de alta concentração de amônio e menor energia. Por outro lado, a via GS-GOGAT, universal em bactérias, ocorre em condições de baixas concentrações de amônio e alta energia (Alibhai e Villafranca, 1994; Bueno Batista e Dixon, 2019).

As proteínas PII também são importantes no acoplamento da FBN com a assimilação de amônio nos níveis transcricional e pós-traducional. Em muitas proteobactérias diazotróficas, a expressão do *nifA* dependente de  $\sigma_{54}$  é controlada pelo sistema regulador de nitrogênio NtrB-NtrC em resposta à modificação covalente e ao estado de ligação ao ligante das proteínas PII (Figura 2) (Merrick e Edwards, 1995). Além disso, a atividade de *nifA* em si é rigorosamente regulada, direta ou indiretamente, pelas proteínas de transdução de sinal de PII (Dixon e Kahn, 2004; Bueno Batista e Dixon, 2019).

### 1.3.1 Controle pós-traducional da atividade da nitrogenase

Além das complexas cascatas de transdução de sinal que acoplam a FBN à assimilação de  $\text{NH}_4^+$ , a atividade da nitrogenase é regulada pela disponibilidade de nitrogênio. Sabe-se que pelo menos três mecanismos diferentes, envolvendo proteínas PII, inibem a atividade da nitrogenase sob condições excessivas de nitrogênio nas proteobactérias. O primeiro mecanismo envolve a inativação da proteína Fe da nitrogenase catalisada pela enzima DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase) (Huerigo *et al.*, 2013). Esta modificação covalente pode ser revertida pela enzima DraG (dinitrogenase redutase glicohidrolase). A atividade DraT e DraG são reguladas pela interação com proteínas PII, dependendo do *status* do nitrogênio. Sob condições excessivas de nitrogênio, as PII não modificadas (GlnB) interagem com a ribosilação da ADP estimuladora de DraT (Moure *et al.*, 2013). Sob condições de limitação de nitrogênio, as formas uridiladas de PII não interagem com DraT ou DraG. Nessas circunstâncias, o DraT é inativa e o DraG é ativa, levando à remoção da modificação do ribosil da proteína Fe da nitrogenase, reativando-a (Bueno Batista e Dixon, 2019).

Um segundo mecanismo para o desligamento da nitrogenase aparentemente envolve a inibição do sistema de transporte de elétrons Rnf1 (codificado por *rnfABCDE*), que potencialmente fornece uma via de transferência de elétrons dedicada a nitrogenase (Ledbetter *et al.*, 2017). Os genes que codificam o complexo Rnf1 são co-localizados com o operon *nifLA* em diversos diazotróficos (SARKAR *et al.*, 2012). Um terceiro mecanismo, ainda não descrito em detalhes, é responsável

pelo desligamento da nitrogenase em organismos sem o sistema de transporte de elétrons DraT – DraG e Rnf (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

### 1.3.2 Organização genômica da nitrogenase

A atividade da nitrogenase de MoFe é a mais utilizada por bactérias diazotróficas (Dos Santos *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016). Além desta, alguns diazotróficos possuem ainda uma das duas versões alternarnativas de nitrogenase, que usam tanto VFe (*vnf*) ou FeFe (*anf*) como cofatores de ferro (Raymond *et al.*, 2004; Angel *et al.*, 2018). Apesar de distintas a nível genético, tanto a nitrogenase de Mo quanto as nitrogenases alternativas possuem subunidades, composição de cofatores e dependência de ATP semelhantes (Rubio e Ludden, 2008). Ademais, a organização e o número de genes *nif* necessários para a síntese e montagem da enzima variam entre bactérias diazotróficas (Dos Santos *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). A tabela 1 resume a descrição e função dos genes *nif* no complexo enzimático da nitrogenase.

**Tabela 1.** Descrição dos genes *nif*, suas funções e produtos. Adaptado: (Buren *et al.*, 2020).

Gene	Descrição	Função
<i>nifH</i>	Proteína de Fe	Doador obrigatório de elétrons para proteína FeMo. Também necessário para biossíntese de co-FeMo e maturação de apo-MoFe.
<i>nifD</i>	Subunidade- $\alpha$ da proteína FeMo	Subunidade de ligação co-Fe. Forma um $\alpha_2\beta_2$ tetrâmero com <i>nifK</i> .
<i>nifK</i>	Subunidade- $\beta$ da proteína FeMo	Subunidade de ligação co-Fe. Forma um $\alpha_2\beta_2$ tetrâmero com <i>nifD</i> .
<i>nifT</i>	-	Função desconhecida
<i>nifY</i>	Chaperona para a proteína apo-MoFe	Transportador de co-FeMo e auxilia na inserção do co-FeMo à proteína apo-MoFe.
<i>nifE</i>	Scaffold de co-NifB	Maturação de co-FeMo. Forma um $\alpha_2\beta_2$ tetrâmero com <i>nifN</i> .
<i>nifN</i>	Scaffold de co-NifB	Maturação de co-FeMo. Forma um $\alpha_2\beta_2$ tetrâmero com <i>nifE</i> .
<i>nifX</i>	Vincula co-NifB e o cluster-VK	Transportador de precursores co-FeMo e interage com apo- <i>nifE</i> N.
<i>nifU</i>	-	Precursor para formação de clusters [Fe-S] para componentes da nitrogenase.

<i>nifS</i>	Cisteína desulfurase	Mobilização de S para síntese e reparo do Fe-S.
<i>nifV</i>	Homocitrato sintase	Síntese de co-FeMo.
<i>nifW</i>	-	Associa-se à proteína apo-MoFe antes da maturação do cluster P.
<i>nifZ</i>	-	Maturação do cluster P com a proteína Fe.
<i>nifF</i>	Flavodoxina	Doador de elétrons da proteína Fe.
<i>nifL</i>	Anti ativador	Atua como antiativador do <i>nifA</i> .
<i>nifA</i>	Ativador transcricional	Forma um sistema regulatório de dois componentes com o <i>nifL</i> .
<i>nifB</i>	-	Essencial para a síntese de FeMo-co. Catalisa a formação de co- <i>nifB</i> , o primeiro passo na biossíntese de co-FeMo.
<i>nifO</i>	-	Necessário para ativação simultânea de nitrogenase e nitrato redutase.
<i>nifQ</i>	-	Processa Mo antes de sua incorporação na FeMo-co.
<i>nifM</i>	Peptidylprolyl cis-trans isomerase	Essencial para maturação da proteína Fe.
<i>nifP</i>	serina O-acetiltransferase	Otimiza a expressão da atividade da nitrogenase aumentando a síntese de metionina e cisteína celular.

Os componentes estruturais da nitrogenase de Mo são codificados pelos genes *nifH*, *nifD* e *nifK*, a nitrogenase V é codificada pelos *vnfH*, *vnfD*, *vnfG* e *vnfK*, e os componentes da nitrogenase somente Fe são produtos dos genes *anfH*, *anfD*, *anfG* e *anfK*. Além disso, são necessários produtos gênicos adicionais para que haja nitrogenases totalmente funcionais (Mus *et al.*, 2016). O co-FeMo é composto por dois centros metálicos (centro de ferro-enxofre e o homocitrato) onde ocorre a redução do substrato (Dixon e Kahn, 2004; Rubio e Ludden, 2008). A síntese e a atividade de todos os tipos de nitrogenases são reguladas em resposta a íons amônio, razão C/N, condições de oxigênio, presença ou ausência de Mo e V e a escuridão/luz no caso de bactérias fototróficas (Mus *et al.*, 2018).

A nitrogenase de Mo é composta por duas metaloproteínas MoFe (*nifDK*) e Fe (*nifH*) em interação (Hoffman *et al.*, 2014; Sickerman *et al.*, 2017) que juntos catalisam a redução de N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub> em uma reação que depende do elétron intra e intermolecular transferência e a energia liberada pela hidrólise do ATP. Cada evento de transferência de elétrons do Fe proteína à proteína MoFe envolve as proteínas para associar e dissociar com a seguinte sequência de eventos: ATP ligação à proteína Fe, formação

complexa com o MoFe proteína, transferência de elétrons, hidrólise de ATP na proteína Fe, Pi liberação e dissociação do complexo nitrogenase (Duval *et al.*, 2013; Buren *et al.*, 2020).

Através de análise de sequenciamento genômico observou-se que quase todos os diazotróficos continham um conjunto mínimo de seis genes *nif* necessários para montar o co-FeMo *in vitro*, a saber: *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN* e *nifB* (Dos Santos *et al.*, 2012). O primeiro diazotrófico cujos genes de fixação de nitrogênio (*nif*) foram analisados foi *Klebsiella pneumoniae* (Macneil *et al.*, 1978; Roberts *et al.*, 1978; Arnold *et al.*, 1988). Em uma única região do cromossomo estão organizados vinte genes *nif* (*nifJHDKTYENXUSVWZMFLABQ*) arranjados em vários *operons* (Rubio e Ludden, 2008).

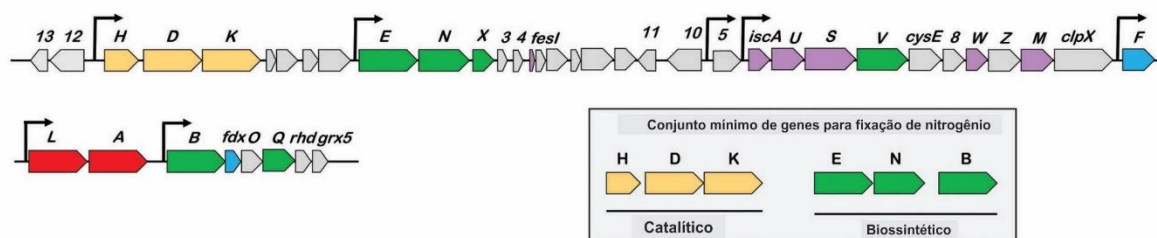
Em *Azotobacter vinelandii*, os genes *nif* estão separados em duas regiões denominadas de agrupamentos principais e secundários (Figura 3) (Setubal *et al.*, 2009). O agrupamento principal contém os três genes estruturais da nitrogenase: FeMo (*nifD* e *nifK*) e Fe (*nifH*) e 32 genes organizados em nove *operons*. Estão presentes genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de co-FeMo (*nifE* e *nifN*), na maturação das proteínas de Fe (*nifM*) e FeMo (*nifH*, *nifW*, *nifZ*), na montagem do conjunto de Fe-S (*nifU*, *nifS*, *iscA*, *cysE1*), homocitrato sintase (*nifV*), proteínas envolvidas na transferência de elétrons para nitrogenase (*nifF*) e proteção contra a oxidação (*feSII*), reciclagem de proteínas biossintéticas (*clpX2*), além de genes acessórios da nitrogenase (*naf*). O cluster secundário contém 17 genes em cinco *operons* e é composto pelo gene *nifB* (essencial) (Shah *et al.*, 1994; Curatti *et al.*, 2006) e por genes importantes para o funcionamento do *nifB* (*fdxN*) ou para o processamento de Mo para nitrogenase (*nifO* e *nifQ*). O operon *nifLA* formado pelo ativador (*nifA*) e pelo antiativador (*nifL*) controla a expressão de genes *nif* em resposta a sinais ambientais, como taxas de assimilação de nitrogênio, presença de O<sub>2</sub>, estado redox da célula, e níveis de ATP (Martinez-Argudo *et al.*, 2004; Mus *et al.*, 2018; Buren *et al.*, 2020).

As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína VFe são codificadas por *vnfD* e *vnfK* em *A. vinelandii* (Lee *et al.*, 2009; Sippel e Einsle, 2017). Os genes que codificam as proteínas da V-nitrogenase são divididos entre dois *operons* (Figura 2).

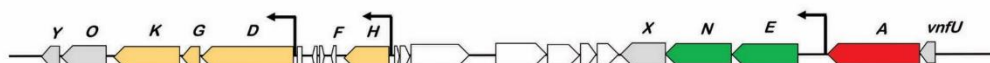
O *operon vnfD*GK, localizado a jusante do gene *vnfH* codifica a subunidade da dinitrogenase redutase e faz parte de um *operon* de dois genes. O gene *vnfD* codifica a subunidade  $\alpha$ , *vnfK* codifica a subunidade  $\beta$  e o *vnfG* codifica a subunidade  $\gamma$ . Outros produtos gênicos necessários para a V-nitrogenase ativa são codificados pelo *operon vnfENX*, localizado a jusante do *vnfH*. O *vnfA* gene está localizado imediatamente a montante do *operon vnfENX*. Além disso, o gene *vnfY*, a jusante do *vnfK*, é necessário para o crescimento diazotrófico dependente de V e parece desempenhar um papel na maturação do cofator FeV e/ou sua inserção na nitrogenase da V-nitrogenase (Mus *et al.*, 2018).

Na proteína de FeFe, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são codificadas por *anfD* e *anfK* (Harris *et al.*, 2018). Os genes estruturais que codificam nitrogenase de FeFe em *A. vinelandii* e *R. palustris* são organizados como um único *operon anfHDGK* (Figura 3) (Joerger *et al.*, 1989; Mylona *et al.*, 1996; Oda *et al.*, 2005). As subunidades da dinitrogenase redutase são codificadas por *anfH*, enquanto as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da dinitrogenase são codificadas por *anfD* e *anfK*. O gene *anfG* codifica uma terceira subunidade ( $\gamma$ ) para a dinitrogenase e é necessário para o crescimento em condições de deficiência de Mo e V (Waugh *et al.*, 1995). O gene *anfA* está localizado imediatamente a montante do *anfHDGK*. O *operon anf* contém dois outros genes, *anfO* e *anfR*, que são necessários ao crescimento diazotrófico dependente de nitrogenase de FeFe mas que não apresenta semelhança com nenhum gene *nif* (Mus *et al.*, 2018).

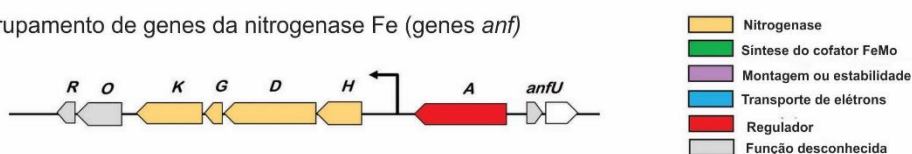
Agrupamento de genes da nitrogenase de Mo (genes *nif*)



Agrupamento de genes da nitrogenase de V (genes *vnf*)



Agrupamento de genes da nitrogenase Fe (genes *anf*)



**Figura 3.** Organização dos agrupamentos de genes da nitrogenase Mo, V e Fe em *A. vinelandii*. Adaptado (Mus *et al.*, 2018).

Considerando a escala de tempo da evolução e importância da FBN, os genes *nif* encontram-se distribuídos entre diferentes grupos de *Archaea* e bactérias. Estima-se que 6 a 15% de todos os genomas microbianos sequenciados possuam o número mínimo de genes *nif* para fornecer a capacidade genética de fixar nitrogênio (Dos Santos *et al.*, 2012; Boyd e Peters, 2013), tornando os diazotróficos um dos mais diversos grupos funcionais (Angel *et al.*, 2018).

#### 1.4 Genômica comparativa

A genômica comparativa estuda os processos de evolução através do alinhamento e análise de genes e genomas de diferentes espécies ou cepas, avaliando a divergência evolutiva em relação a um ancestral comum, a estrutura, organização e funções dos genes e outras regiões dos genomas (Hardison, 2003; Catanho *et al.*, 2007).

Análises comparativas entre as sequências genômicas de diferentes microrganismos vem contribuindo para o entendimento de aspectos fundamentais da genética, bioquímica e evolução das espécies (Abby e Daubin, 2007). As análises são realizadas a partir da comparação de uma ou mais sequências de entrada (*query*

*sequences*) com outras inúmeras sequências depositadas em um banco de dados (*subject sequences*). O alinhamento entre as sequências de entrada e as sequências depositadas no banco de dados é tipicamente realizado com a utilização de um algoritmo de alinhamento local, como o BLAST (do inglês “*Basic Local Alignment Search Tool*”) (Altschul *et al.*, 1997).

As sequências de nucleotídeos ou aminoácidos são comparadas por dois parâmetros principais: cobertura e identidade. Cobertura é o percentual de comprimento de uma sequência que se deseja comparar (*query*) em relação a outra sequência conhecida (*subject*). A identidade é o percentual de aminoácidos (ou nucleotídeos) idênticos entre as sequências alinhadas (Moreira, 2015). Quando combinadas entre si e com as coordenadas genômicas, as comparações gênicas par-a-par podem ser ainda utilizadas em análises de sintenia, que visam comparar a ordem dos genes em diferentes organismos e como esta se altera ao longo do tempo (Catanho *et al.*, 2007; Moreira, 2015). Além das análises par-a-par, sequências de nucleotídeos ou aminoácidos podem também ser alinhadas em conjunto (alinhamentos múltiplos). Essas análises auxiliam na identificação de blocos conservados em genes ou proteínas de uma mesma família, além de serem úteis também em estudos de reconstrução filogenética, essenciais ao entendimento de processos evolutivos. (Woese *et al.*, 1990; Yokono *et al.*, 2018).

Estudos comparativos baseados em análises de pangenoma têm se tornado uma abordagem eficaz para identificação de genes relacionados a diferentes estilos de vida (Vernikos *et al.*, 2015). As análises de pangenoma consistem na determinação de um núcleo de genes comum a todas as estirpes de uma espécie (*core* genoma), um núcleo de genes distribuídos entre algumas estirpes (genoma acessório) e de um conjunto de genes que diferencia as estirpes umas das outras (genoma único). O *core* genoma é composto por genes constitutivos, essenciais à espécie, provavelmente herdados de um ancestral comum e pouco propensos a transferência horizontal de genes (HGT- *Horizontal gene transfer*). O genoma acessório possui genes frequentemente relacionados com a adaptação e a colonização de determinados ambientes por diferentes populações e, portanto, potencialmente relacionados ao estilo de vida dos organismos. Além disto, dentro desse grupo também estão

presentes os genes específicos de cada estirpe, provavelmente adquiridos por HGT (Rouli *et al.*, 2015).

Em um outro estudo, Albright e colaboradores (2019) estudaram mais de 6000 genomas completos de bactérias e arqueas disponíveis publicamente e identificaram 11 vias de ciclagem de nitrogênio (N). Vias incompletas do ciclo N ocorreram em 39% das espécies, revelando uma limitação nas atuais análises com genes marcadores. Um ou alguns genes de interesse são normalmente usados para representar a prevalência de uma reação biogeoquímica. Porém, a inferência imprecisa de uma via funcional baseada na presença do gene marcador pode contribuir para a falha. Além disso, o estudo demonstrou que maioria dos organismos apresentaram capacidade limitada no uso de N inorgânico em múltiplos estados de oxidação. A troca de compostos inorgânicos de N é comum entre os organismos, destacando a importância da composição da comunidade e da estrutura espacial na determinação da extensão da reciclagem versus perda em um ecossistema.

Comparações entre isolados de *Leptospirillum ferriphilum* revelaram uma diversidade intraespecífica entre os genomas, no qual a perda e inserção de novos blocos genéticos provavelmente são mediados por fagos, contribuindo para a heterogeneidade genômica da espécie. Indicativos de que um agrupamento de genes *nif* identificado em alguns dos genomas analisados foram herdados de um ancestral, em vez de transferência lateral. Os resultados sugerem que a população de *L. ferriphilum* sofre recombinação genética frequente, com impacto em sua fisiologia e na adaptação a diferentes nichos (Liu *et al.*, 2020).

Diversos estudos objetivando a transferência direta de genes *nif* de diazotróficos para culturas de cereais através da reconstituição da via biossintética da nitrogenase em um hospedeiro eucariótico vem sendo realizados. Para tanto, uma etapa importante neste sentido é a identificação do número mínimo de genes *nif* necessários para a função nitrogenase nessas culturas. Espera-se que as culturas de cereais fixem seu próprio nitrogênio, visando reduzir o uso excessivo de fertilizantes químicos na agricultura (Li e Chen, 2020).

O melhor entendimento da evolução e diversidade dos operons *nif*, bem como sua correlação com a eficiência da FBN, contribui não somente para a compreensão

da bioquímica deste processo, como também para a elaboração de possíveis cassetes gênicos para a criação de microrganismos diazotróficos com potencial biotecnológico para a agricultura.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a diversidade e organização de genes *nif* em operons em genomas de bactérias pertencentes aos gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Nitrospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Paraburkholderia*.

### **2.2 Objetivos específicos**

A - Identificar os genes *nif* dos genomas de diferentes espécies de bactérias diazotróficas;

B - Analisar a prevalência dos genes *nif* e a forma que estão organizados nos genomas.

C - Analisar as regiões regulatórias dos genes *nif*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção e análises de similaridade dos genomas

Todos os genomas pertencentes aos gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Nitrospirillum* e *Paraburkholderia* foram obtidos dos bancos de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Joint Genome Institute (JGI), com última atualização em 20/08/2019 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Relação dos genomas disponíveis nos bancos de dados do *GenBank* e JGI com base no gênero e quantidade de espécies. Fonte: NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Classe	Gênero	Nº Espécies	Nº Genomas Disponíveis
Alphaproteobacteria	<i>Azospirillum</i>	7	55
	<i>Nitrospirillum</i>	1	8
	<i>Gluconacetobacter</i>	3	7
Betaproteobacteria	<i>Azoarcus</i>	3	14
	<i>Herbaspirillum</i>	11	47
	<i>Paraburkholderia</i>	49	148

Foram organizadas tabelas dos gêneros com o código de acesso as sequências de referência, o tamanho de cada genoma, a fonte de isolamento e a referência bibliográfica de todos os isolados. Os genomas classificados como fragmentados (*draft*) foram submetidos à predição de plasmídeos com o algoritmo PlasFlow (Krawczyk *et al.*, 2018), utilizando o parâmetro “threshold=0.05”. O PlasFlow se baseia nos modelos de rede neural adaptados para sequências completas de genomas e plasmídeos e é capaz de discriminar sequências de plasmídeos e cromossomos com precisão de até 96% em dados WGS (*Whole Genome Sequencing Analysis*).

#### 3.2 Montagem do banco de dados

Inicialmente foi realizado o levantamento e identificação dos genes responsáveis pela composição da enzima nitrogenase nos diferentes gêneros de bactérias diazotróficas. Foram identificados 21 genes *nif* (*nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifF*,

*nifH*, *nifJ*, *nifK*, *nifL*, *nifM*, *nifN*, *nifP*, *nifQ*, *nifS*, *nifT*, *nifU*, *nifV*, *nifW*, *nifX*, *nifY*, *nifZ*) que compõem o complexo da nitrogenase (tabela 3). Também foi incluído o gene *nifO*, relatado em vários estudos com *Azotobacter vinelandii* (Rodriguez-Quinones *et al.*, 1993; Bosch *et al.*, 1995; Bosch *et al.*, 1997; Navarro-Rodriguez *et al.*, 2019).

Krause <i>et al.</i> , 2006	Bertalan <i>et al.</i> , 2009	Pedrosa <i>et al.</i> , 2011	Kaneko <i>et al.</i> , 2010	De Meyer <i>et al.</i> , 2016
<i>Azoarcus</i> sp. BH72	<i>Gluconacetobacter</i> <i>diazotrophicus</i> PAL5	<i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i>	<i>Azospirillum</i> sp. B510	<i>Burkholderia</i> <i>species</i>
<i>nifA</i>	<i>nifA</i>	<i>nifA</i>	<i>nifA</i>	<i>nifA</i>
-	<i>nifB</i>	<i>nifB</i>	<i>nifB</i>	<i>nifB</i>
<i>nifD</i>	<i>nifD</i>	<i>nifD</i>	<i>nifD</i>	<i>nifD</i>
-	-	<i>nifE</i>	<i>nifE</i>	<i>nifE</i>
<i>nifF</i>	-	-	<i>nifF</i>	-
<i>nifH</i>	<i>nifH</i>	<i>nifH</i>	<i>nifH</i>	<i>nifH</i>
-	-	-	<i>nifJ</i>	-
<i>nifK</i>	<i>nifK</i>	<i>nifK</i>	<i>nifK</i>	<i>nifK</i>
<i>nifL</i>	-	-	-	-
<i>nifM</i>	-	-	-	-
-	-	<i>nifN</i>	<i>nifN</i>	<i>nifN</i>
<i>nifP</i>	-	-	-	-
-	<i>nifQ</i>	<i>nifQ</i>	<i>nifQ</i>	<i>nifQ</i>
<i>nifS</i>	<i>nifS</i>	<i>nifS</i>	<i>nifS</i>	-
<i>nifT</i>	-	-	<i>nifT</i>	<i>nifT</i>
<i>nifU</i>	<i>nifU</i>	<i>nifU</i>	<i>nifU</i>	-
-	-	<i>nifV</i>	<i>nifV</i>	<i>nifV</i>
<i>nifW</i>	-	<i>nifW</i>	<i>nifW</i>	<i>nifW</i>
-	<i>nifX</i>	<i>nifX</i>	<i>nifX</i>	<i>nifX</i>
<i>nifY</i>	-	-	-	-
<i>nifZ</i>	-	<i>nifZ</i>	<i>nifZ</i>	<i>nifZ</i>

**Tabela 3.** Tabela com a presença e ausência de genes *nif* nos gêneros em estudo.

As espécies *Azospirillum amazonense* foram reclassificadas como *Nitrospirillum amazonense*, separando-se do gênero *Azospirillum* (Lin *et al.*, 2014; Oren e Garrity, 2016). Estas espécies também foram incluídas no banco de dados para análise. Em 2016, foi proposta a divisão do gênero *Burkholderia* em dois gêneros de acordo com a separação filogenética de espécies ambientais, reclassificadas para

o gênero *Paraburkholderia*, e aquelas majoritariamente patogênicas, que foram mantidas no gênero *Burkholderia* (Dobritsa e Samadpour, 2016). Com isso, apenas o gênero *Paraburkholderia* foi utilizado para as análises.

Posteriormente todas as sequências revisadas de genes *nif* foram obtidas na base de dados Uniprot (Uniprot, 2017), com base nas referências da literatura. Através da ferramenta uCLUST (Prasad *et al.*, 2006; Edgar, 2010), as sequências foram ordenadas de acordo com o seu tamanho e agrupadas utilizando percentual de identidade de alinhamento maior ou igual a 80%. Em seguida, foram selecionadas as sequências representativas de cada agrupamento. Por fim, foi criado um banco de dados concatenando todos os arquivos que possuíam as sequências representativas de cada gene *nif*.

### 3.3 Comparações genômicas

As similaridades entre os genomas obtidos no banco de dados *GenBank* e JGI foi avaliada através da análise ANI (Average Nucleotide Identity), através do módulo Pyani (Pritchard *et al.*, 2016). Esta análise envolve a fragmentação genômica *in silico*, em segmentos de 1.020 nucleotídeos, que são alinhados via BLAST contra o genoma de referência a fim de calcular a identidade média de nucleotídeos. Valores superiores a 95% indicam que os genomas analisados pertencem à mesma espécie (Richter e Rossello-Mora, 2009).

As sequências e os genes potencialmente envolvidos na FBN foram analisados com o uso da ferramenta BLASTp (Altschul *et al.*, 1997) usando limiares mínimos de similaridade e cobertura de 75% e 80% respectivamente, e *e-value* máximo de  $1e^{-15}$ . Os resultados de cada análise foram representados em um gráfico de presença e ausência e combinados com as reconstruções filogenéticas.

### 3.4 Pangenoma

Como forma de avaliar a proximidade dos genomas de cada gênero em relação a conservação dos genes *nif*, foi utilizada a análise de pangenoma. Para execução da filogenia de *core* genoma foi utilizado o software BPGA 1.3.0 (Chaudhari *et al.*, 2016). Esse software possui dependências como o algoritmo MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004)

e USEARCH (Edgar, 2010) para alinhamento de sequências, e o gnuplot 4.6.6 para geração de gráficos. Nesta abordagem foi utilizado limiar de 60% de identidade e foram gerados os alinhamentos de *core* genes. Em seguida, foi utilizado o editor de alinhamento TrimAL (Capella-Gutierrez *et al.*, 2009) para a remoção de blocos contendo muitos *gaps*, de acordo com *score* de cada alinhamento.

### 3.5 Análise Filogenética

A reconstrução filogenética baseada nas sequências dos genes presentes no *core* genoma foi conduzida com o método de máxima verossimilhança - Maximum Likelihood (ML) (Felsenstein, 1981) com 1.000 replicatas de *bootstrap*, através do *software* IQ-TREE 1.6.1 (Nguyen *et al.*, 2015). As sequências de cada gene do *core* genoma foram previamente alinhadas pelo algoritmo MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004) e concatenadas em sequências únicas para cada genoma através de algoritmos integrados no *software* BPGA (Chaudhari *et al.*, 2016).

Em seguida, foi realizada a comparação da topologia de árvores filogenéticas dos genes *nifH*, *nifD*, *nifH*, *nifK*, *nifE* e *nifN* com a árvore filogenética com todos os genomas que apresentaram genes *nif*. A reconstrução filogenética de genomas foi realizada utilizando as sequências do *core* genoma e os mesmos parâmetros descritos no parágrafo anterior. As árvores filogenéticas dos genes foram construídas através do alinhamento múltiplo das sequências de cada gene utilizando MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004) seguido da reconstrução filogenética através do *software* IQ-TREE 1.6.1 (Nguyen *et al.*, 2015) utilizando o algoritmo integrado Modelfinder para predição do melhor modelo evolutivo. A visualização da árvore foi realizada pela ferramenta iTOL3 (<https://itol.embl.de/>) (Letunic e Bork, 2007; 2016).

### 3.6 Alinhamento de operons

A predição dos *operons* foi realizada através do servidor Operon-mapper (Taboada *et al.*, 2018), que se baseia na distância entre genes vizinhos e suas relações funcionais. Esta análise foi feita com os genomas baixados anteriormente no *GenBank*. A integração das estruturas dos *operons* contendo genes *nif* foi representada graficamente para facilitar a comparação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção das sequências

Foram obtidas 279 sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* do NCBI e JGI. No Apêndice 1 encontra-se a descrição de todas as sequências utilizadas com o número de acesso, tamanho do genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica.

Os tamanhos dos genomas de *Azoarcus* variaram entre 3,22 e 5,92 Mb. O gênero é composto tanto por espécies endofíticas quanto de vida livre que habitam águas e solos.

Os genomas de *Azospirillum* e *Nitrospirillum* apresentaram tamanhos entre 6,24 - 8,34 Mb e 6,32 - 7,38 Mb, respectivamente. Grande parte das espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum* foram isoladas do solo, rizosfera e ambiente endofítico, sendo uma minoria isolada de água. Já as espécies de *Nitrospirillum* foram isoladas em sua totalidade de *Brachiaria*.

O gênero *Gluconacetobacter* é o grupo com menor número de espécies analisadas. Seus genomas variam entre 3,60 e 4,23 Mb. As cepas de *G. diazotrophicus* foram isoladas de raízes de cana-de-açúcar. Os isolados de *G. liquefaciens* foram obtidos de frutos secos (*Diospyros* sp.) e os isolados de *G. entanii* e *Gluconacetobacter* sp. SXCC-1 da fermentação de vinagre.

Os genomas pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* variam entre 4,58 e 6,49 Mb. A fonte de isolamento do gênero é bem diversa, sendo composta por clínicas e não patogênicas (de água, solo, rizosfera e ambiente endofítico). Por fim, todas as espécies de *Paraburkholderia* são ambientais, e seus genomas variaram entre 4,04 e 11,15 Mb.

## 4.2 Anotação dos genes *nif*

As sequências de cada gene *nif* específico foram obtidas do Uniprot (Tabela 4). Através de um procedimento de filtragem descrito anteriormente, foram obtidas sequências representativas de cada gene, que foram então utilizadas nas análises subsequentes.

**Tabela 4. Sequências de genes *nif*.** Números de sequências obtidas do Uniprot, antes e após filtragem.

Gene	Sequências do Uniprot	Sequências representativas
<i>nifA</i>	457	294
<i>nifB</i>	1483	438
<i>nifD</i>	2283	420
<i>nifE</i>	1065	288
<i>nifF</i>	79	37
<i>nifH</i>	3377	420
<i>nifJ</i>	1817	602
<i>nifK</i>	2160	441
<i>nifL</i>	64	30
<i>nifM</i>	144	73
<i>nifN</i>	772	224
<i>nifO</i>	23	16
<i>nifP</i>	22	19
<i>nifQ</i>	995	390
<i>nifS</i>	57	38
<i>nifT</i>	853	218
<i>nifU</i>	5182	1717
<i>nifV</i>	864	447
<i>nifW</i>	1155	377
<i>nifX</i>	2401	1055
<i>nifY</i>	99	32
<i>nifZ</i>	1491	505

## 4.3 Genômica comparativa

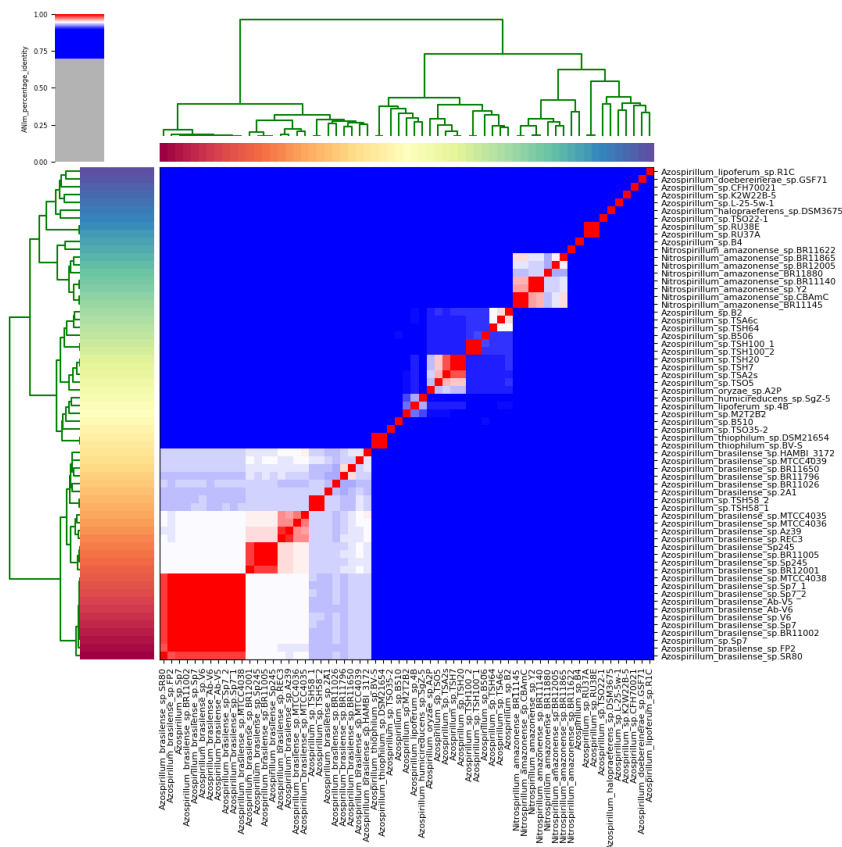
### 4.3.1 Similaridade genômica

Através de cálculos de ANI realizados pelo algoritmo Pyani, foi observado que a espécie *Azospirillum* sp. Sp7 pertence a um clado com genomas de *A. brasilense*

(Figura 4), identidade de 98% a 99% com os genomas *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* V6, *A. brasilense* BR11002, *A. brasilense* Sp7\_1, *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* MTCC4038, *A. brasilense* FP2, *A. brasilense* SR80 e *A. brasilense* Ab-V6. De acordo com Pritchard e colaboradores (2016), valores de ANI acima de 95% indicam genomas pertencentes a mesma espécie. Dessa forma, nossos resultados indicam que o genoma de *Azospirillum* sp. Sp7 pode ser reclassificado como *A. brasilense*.

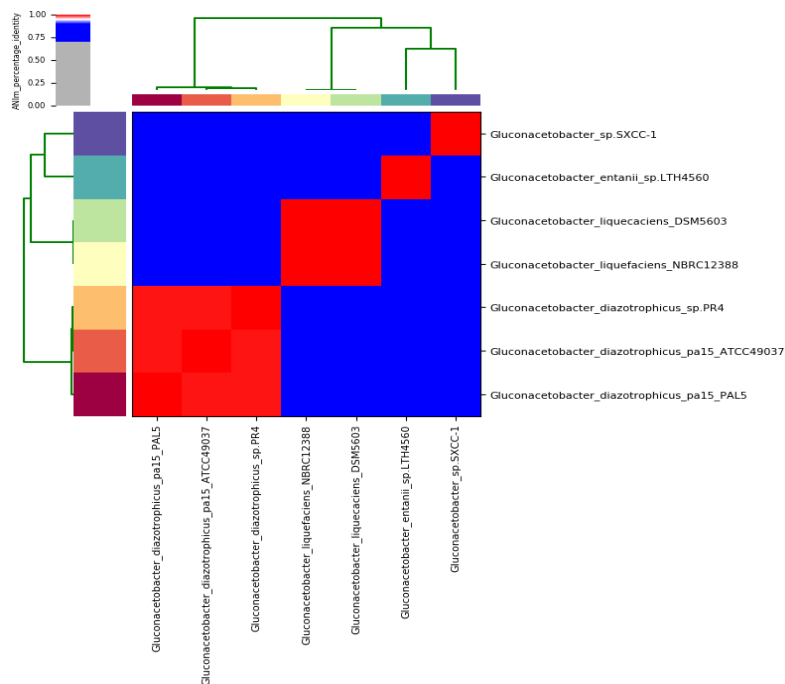
Os genomas de *Azospirillum* sp. TSA2s, *Azospirillum* sp. TSH7, *Azospirillum* sp. TSO5 e *Azospirillum* sp. TS20 possuem uma identidade de 96% e 98% entre si. Um alto valor de ANI (99%) também foi observado entre as espécies *Azospirillum* sp. RU37A e *Azospirillum* sp. RU38E. Os dois grupos de genomas formaram clados separados das demais espécies, indicando que estes isolados pertençam a espécies que ainda por descrever.

Todos os genomas obtidos do gênero *Nitrospirillum* pertencem à espécie *N. amazonense*. Através da análise de ANI foi possível observar *Nitrospirillum* é classificado dentro do gênero de *Azospirillum*, demonstrando uma proximidade entre os gêneros ou mesmo levantando dúvidas sobre a real separação dos mesmos como gêneros distintos.



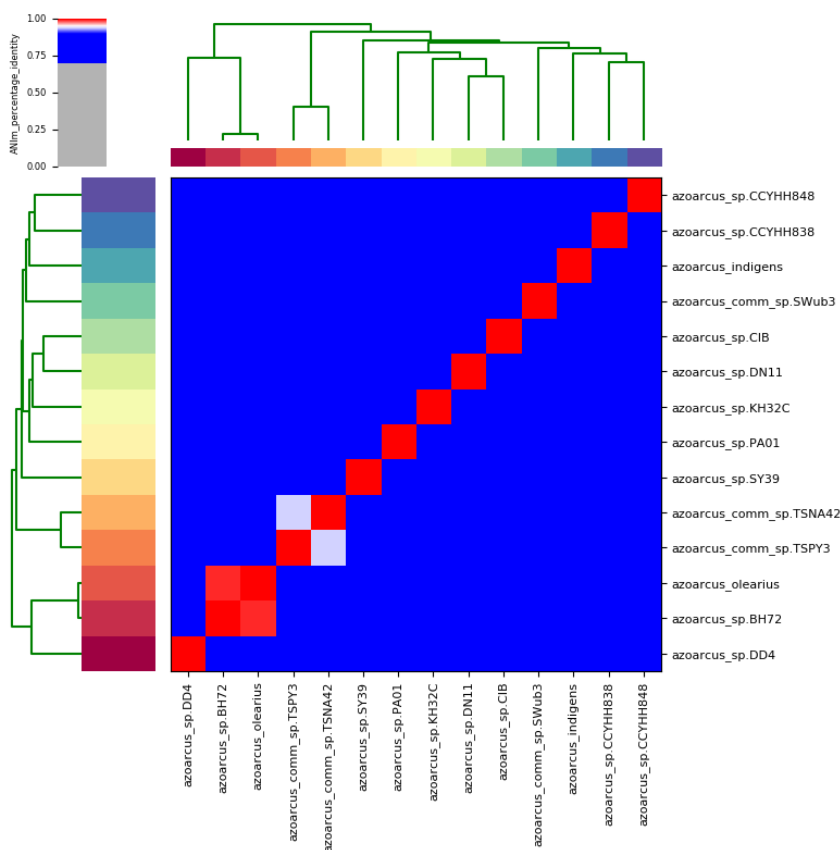
**Figura 4. Análise de ANI dos 63 genomas de *Azospirillum* e *Nitrospirillum*.** Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente.

Também através da análise de ANI de 7 espécies de *Gluconacetobacter*, foi possível identificar alta similaridade interespecífica (Figura 5). Os isolados *G. liquefaciens* DSM5603 e *G. liquefaciens* NBRC12388 também apresentaram alta identidade entre si, em torno de 99%, assim como observado entre os isolados de *G. diazotrophicus*.



**Figura 5. Análise de ANI dos 7 genomas de *Gluconacetobacter*.** Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente.

A maior parte dos genomas de *Azoarcus* não apresentaram identidade suficientemente alta ( $\geq 95\%$ ) para que fossem classificados dentro da mesma espécie. Dentre estes genomas, apenas *Azoarcus* sp. BH72 e *A. olearius* apresentaram alta identidade entre si (98%), indicando que a primeira possa ser reclassificada (Figura 6).

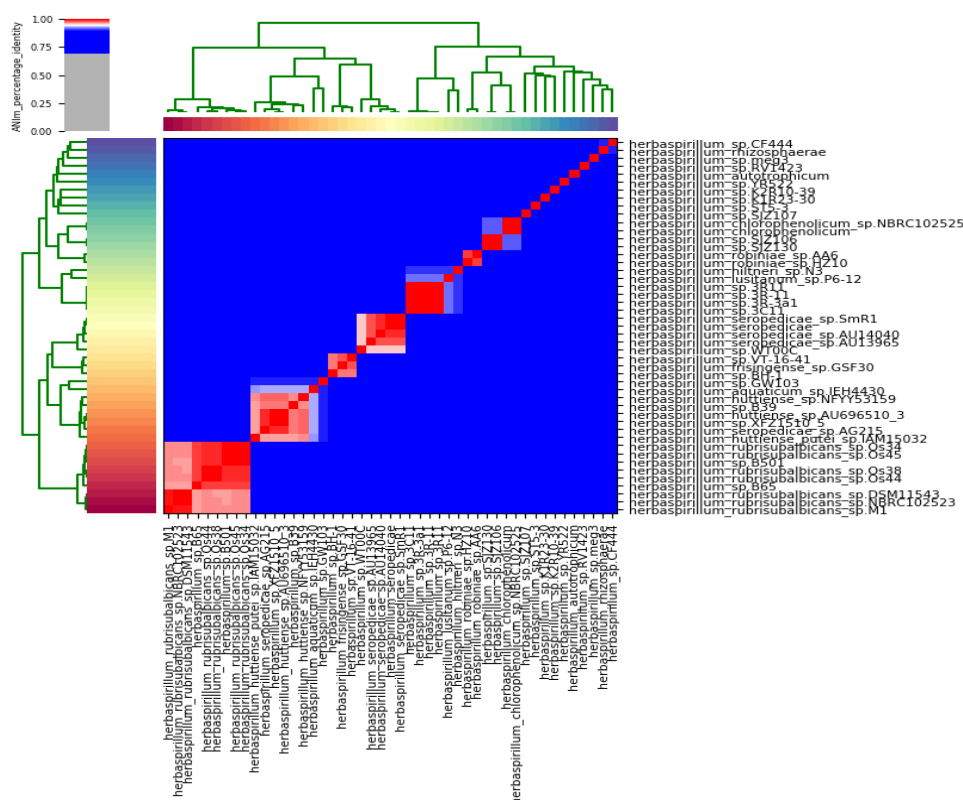


**Figura 6. Análise de ANI entre 14 genomas de *Azoarcus*.** Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente.

A análise de ANI nos permitiu ainda inferir que *Herbaspirillum* sp. B65 e *Herbaspirillum* sp. B501 pertencem a espécie *H. rubrisubalbicans*. Estes isolados, além da identidade de 98% entre si, apresentaram entre 97% e 99% de identidade com *H. rubrisubalbicans* M1, *H. rubrisubalbicans* NBRC102523, *H. rubrisubalbicans* DSM11543, *H. rubrisubalbicans* Os45, *H. rubrisubalbicans* Os34, *H. rubrisubalbicans* Os44 e *H. rubrisubalbicans* Os38 (Figura 7).

No gênero *Herbaspirillum*, a análise de ANI nos permitiu inferir que *Herbaspirillum* sp. BH-1 e *Herbaspirillum* sp. VT-16-41 são na verdade isolados de *H. frisingense*, em face aos valores de identidade de 97% e 98% com *H. frisingense* GSF30. Ainda em *Herbaspirillum*, *H. seropedicae* AG215 apresentou um baixo valor de identidade (88%) com os demais isolados de *H. seropedicae*. Nossos resultados indicam que este genoma esteja mal classificado, particularmente se observados os valores de 97 e 99% que este apresentou com os isolados de *H. huttiense*. Outros

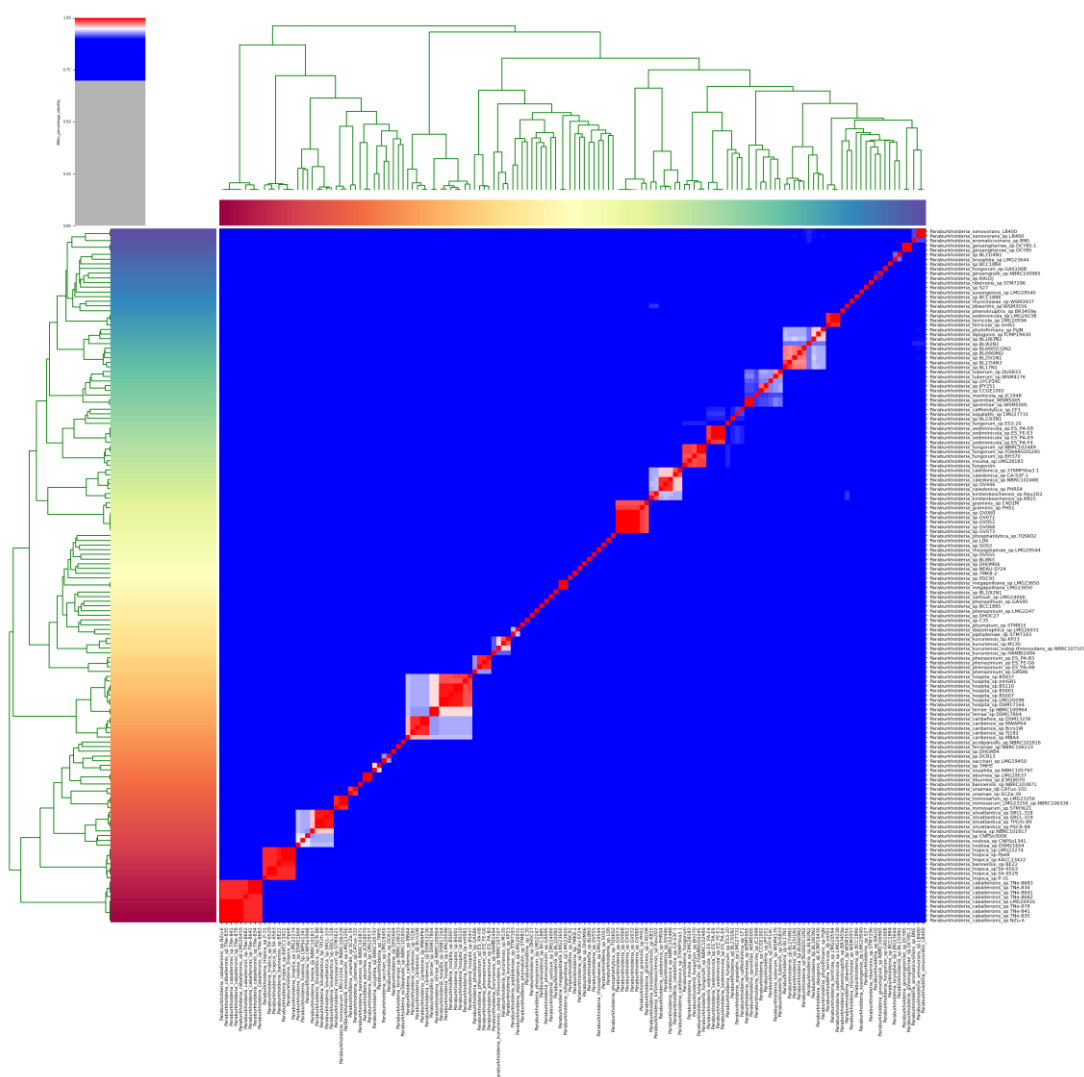
dois isolados sem espécie determinada, *Herbaspirillum* sp. XFZ1510\_5 e *Herbaspirillum* sp. B39, também apresentaram alta identidade com os isolados de *H. huttiense*. O genoma de *Herbaspirillum* sp. WT00C apresentou identidade de 96% com quatro genomas de *H. seropedicae*. Já os genomas de *Herbaspirillum* sp. 3C11, *Herbaspirillum* sp. 3R-11 *Herbaspirillum* sp. 3R11 e *Herbaspirillum* sp. 3R-3a1 apresentaram identidade de 99% entre si, assim como observado com os genomas *Herbaspirillum* sp. SJZ106 e *Herbaspirillum* sp. SJZ130.



**Figura 7. Análise de ANI entre 47 genomas de *Herbaspirillum*.** Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente.

Os genomas *Paraburkholderia* sp. GV052, *Paraburkholderia* sp. GV072, *Paraburkholderia* sp. GV060, *Paraburkholderia* sp. GV073 e *Paraburkholderia* sp. GV068 apresentam alta similaridade (98%) com dos genomas de *P. graminis*, enquanto o genoma *Paraburkholderia* sp. OV446 apresentou identidade de 96 a 99% com as espécies de *P. caledonica* (Figura 8). *P. sediminicola* LMG24238 apresentou identidade mais alta com *P. terricola* (99%) do que com os demais isolados de *P. sediminicola* (em torno de 88%) (Figura 8). Todos os genomas de *P. terrae* e *P. hospita*

apresentaram identidade de 95% entre si, indicando que estas espécies possam ser a mesma. Altos valores da identidade (99%) foram observados entre *P. bannensis* BE22 e todos os isolados de *P. tropica*. Também foi analisado que *P. insulsa* LMG28183 apresentou identidade de 98% com todos os isolados de *P. fungorum*. Além disso, *Paraburkholderia* sp. BL6665CI2N2, *Paraburkholderia* sp. BL17N, *Paraburkholderia* sp. BL25I1N1, *Paraburkholderia* sp. BL27I4N3 e *Paraburkholderia* sp. BL6669N2 apresentaram 97% de identidade entre si, indicando que pertençam a mesma espécie. Finalmente, *Paraburkholderia* sp. 7MH5 apresentou um valor de ANI (96%) com *P. oxyphila* NBRC105797 (Figura 8).



**Figura 8. Análise de ANI entre 148 genomas de *Paraburkholderia*.** Células vermelhas e azuis denotam alta (> 95%) e baixa (< 95%) similaridade genômica, respectivamente.

### 4.3.2 Diversidade genômica

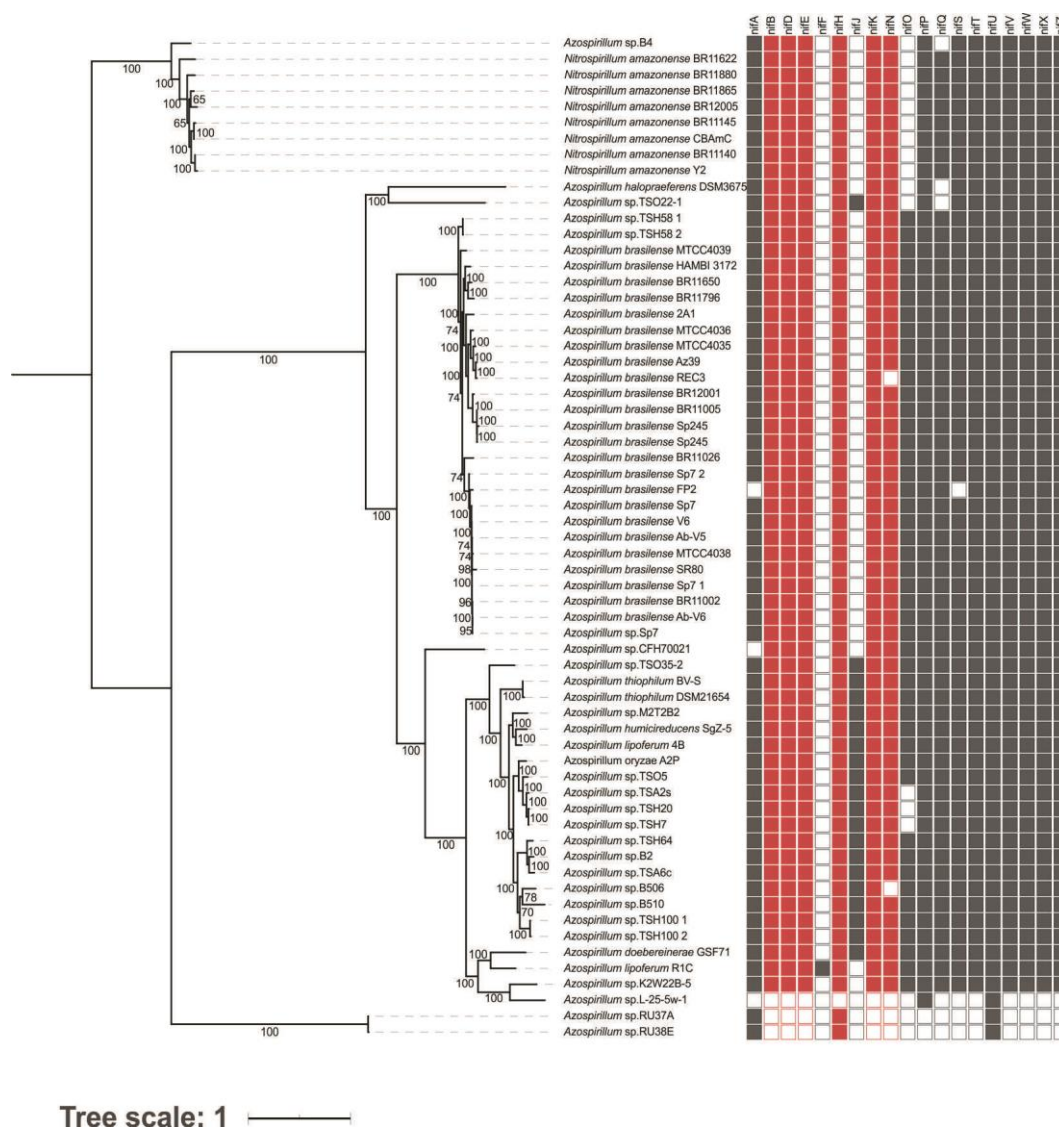
Análises de pangenoma podem proporcionar informações sobre a diversidade genômica de um grupo bacteriano específico (Tettelin *et al.*, 2008). Para obter informações sobre o *core* genoma e as relações filogenéticas entre as espécies, realizamos análises de pangenoma para cada gênero e associamos com a matriz de presença e ausência dos genes *nif* obtidos pela busca dos genes de referência nos genomas selecionados.

Dada a alta similaridade entre *Azospirillum* e *Nitrospirillum*, a análise de pangenoma destes gêneros foi conduzida em conjunto. A reconstrução filogenética foi realizada com os 552 *core* genes presentes em 63 genomas. Através das comparações genômicas descritas no tópico 3.3, foi construída uma matriz de presença e ausência, que foi agregada à árvore filogenética (Figura 9). Dentre os 22 genes *nif* analisados, 19 foram encontrados em *Azospirillum* e *Nitrospirillum*. Em 2010, Kaneko e colaboradores publicaram o genoma completo de *Azospirillum* sp. B510, onde foram relatados 17 genes *nif*. Além dos genes descritos neste artigo, encontramos ainda *nifP* e *nifO*, muito embora este último esteja ausente em *Nitrospirillum*.

Dentre os isolados analisados, *A. lipoferum* RC1 foi o único que apresentou *nifF*. Ademais, somente *Azospirillum* sp. TSO22-1 e outros genomas pertencentes a um clado parafilético de *Azospirillum* apresentaram o gene *nifJ*. Os genes *nifM* e *nifY*, responsáveis pela maturação e acoplamento da proteína Fe no complexo enzimático, não foram localizados em *Azospirillum* e *Nitrospirillum*, sugerindo que estas funções sejam desempenhadas por outros genes.

*Azospirillum* sp. RU37a, *Azospirillum* sp. RU38e e *Azospirillum* sp. I-25-5w-u, isolados de ambientes aquáticos, não apresentaram o conjunto dos principais genes do complexo da nitrogenase, ao contrário de outro isolado de ambiente aquático, *Azospirillum* sp. K2W22B-5. Este resultado sugere que a presença dos genes responsáveis pela FBN não é uma característica exclusiva de bactérias do solo ou associadas às plantas. De acordo com Capone e colaboradores (2008), algumas  $\alpha$ -proteobactérias são capazes de realizar a FBN em ambientes aquáticos e poderiam

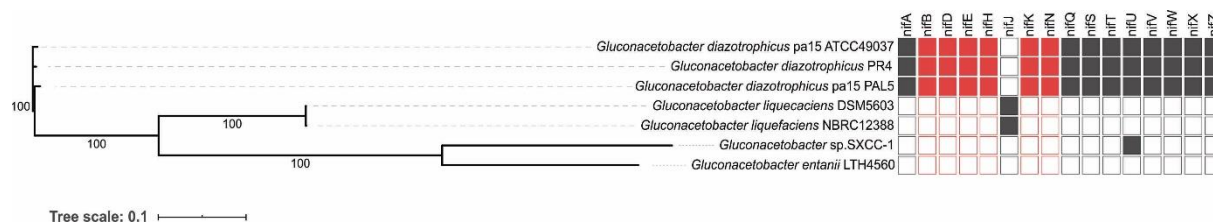
aumentar, embora com limitações, a disponibilidade de nitrogênio em lagos e oceanos.



**Figura 9. Presença e ausência de 19 genes *nif* em 63 genomas de *Azospirillum* e *Nitrospirillum*.** Células vermelhas e cinzas representam a presença de *nif*HDKENB e de outros genes *nif*, enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma *core* (552 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de *bootstrap*.

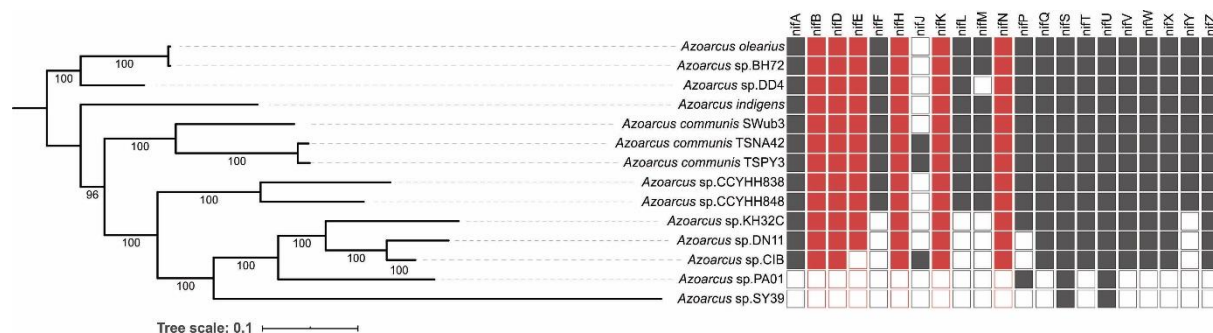
Através das análises de pangenoma em *Gluconacetobacter* foi possível recuperar 1137 *core* genes, que foram usados para a reconstrução filogenética da espécie (Figura 10). De acordo com os resultados obtidos pela comparação dos genomas com os genes de referência, apenas isolados de *G. diazotrophicus*, obtidos

de raízes de cana-de-açúcar, possuem os genes *nif*. Na publicação do genoma completo de *G. diazotrophicus* PAL5, foram reportados apenas 9 genes *nif*. Em nosso trabalho, identificamos 16 genes *nif* dentre os 22 analisados. Dentre os genes importantes não identificados pelos autores, encontramos genes como *nifE* e *nifN*, além de *nifT*, *nifV*, *nifW* e *nifZ*. Os genes *nifM* e *nifY*, relacionados com maturação e acoplamento da proteína Fe no complexo enzimático, *nifL* (antiativador do *nifA*), não foram localizados nos genomas do gênero (Bertalan *et al.*, 2009).



**Figura 10. Presença e ausência de 16 genes *nif* em 7 genomas de *Gluconacetobacter*.** Células vermelhas e cinzas representam a presença de *nifHDKENB* e de outros genes *nif*, enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma *core* (1137 de genes) foi reconstruída usando o método estatístico de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de *bootstrap*.

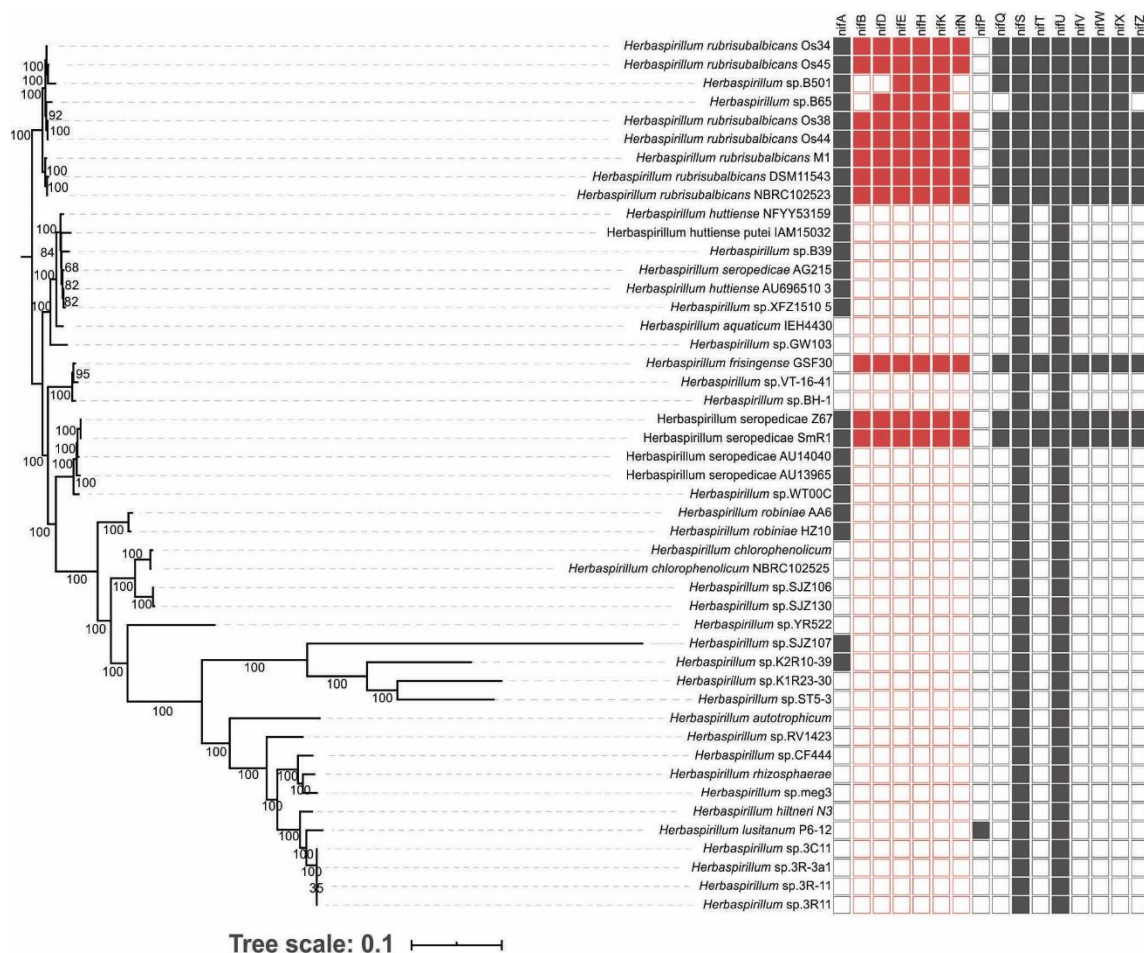
A análise de conduzida com 16 genomas de isolados de *Azoarcus* endofíticos e de vida livre (de água e solos) resultou num pangenoma com 906 *core* genes (Figura 11). O genoma completo do isolado endofítico, *Azoarcus* sp. BH72 foi publicado por Krause e colaboradores em 2006. Nesse estudo foi descrita a presença de 14 genes *nif*. Além destes genes *nif* já descritos, identificamos em nosso trabalho os genes *nifB*, *nifE*, *nifJ*, *nifN*, *nifQ*, *nifV* e *nifX*. Ou seja, 21 dos 22 genes de referência foram identificados em *Azoarcus*. Todos os genomas de *Azoarcus* oriundos de ambientes aquáticos não apresentaram os genes *nifF*, *nifL*, *nifM* e *nifY*. Adicionalmente, os genomas das cepas PA01 e SY39 não apresentaram os principais genes que compõem o complexo da nitrogenase.



**Figura 11. Presença e ausência de 21 genes *nif* em 14 genomas de *Azoarcus*.** Células vermelhas e cinzas representam a presença de *nif*<sup>HDKENB</sup> e de outros genes *nif*, enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma *core* (906 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de bootstrap.

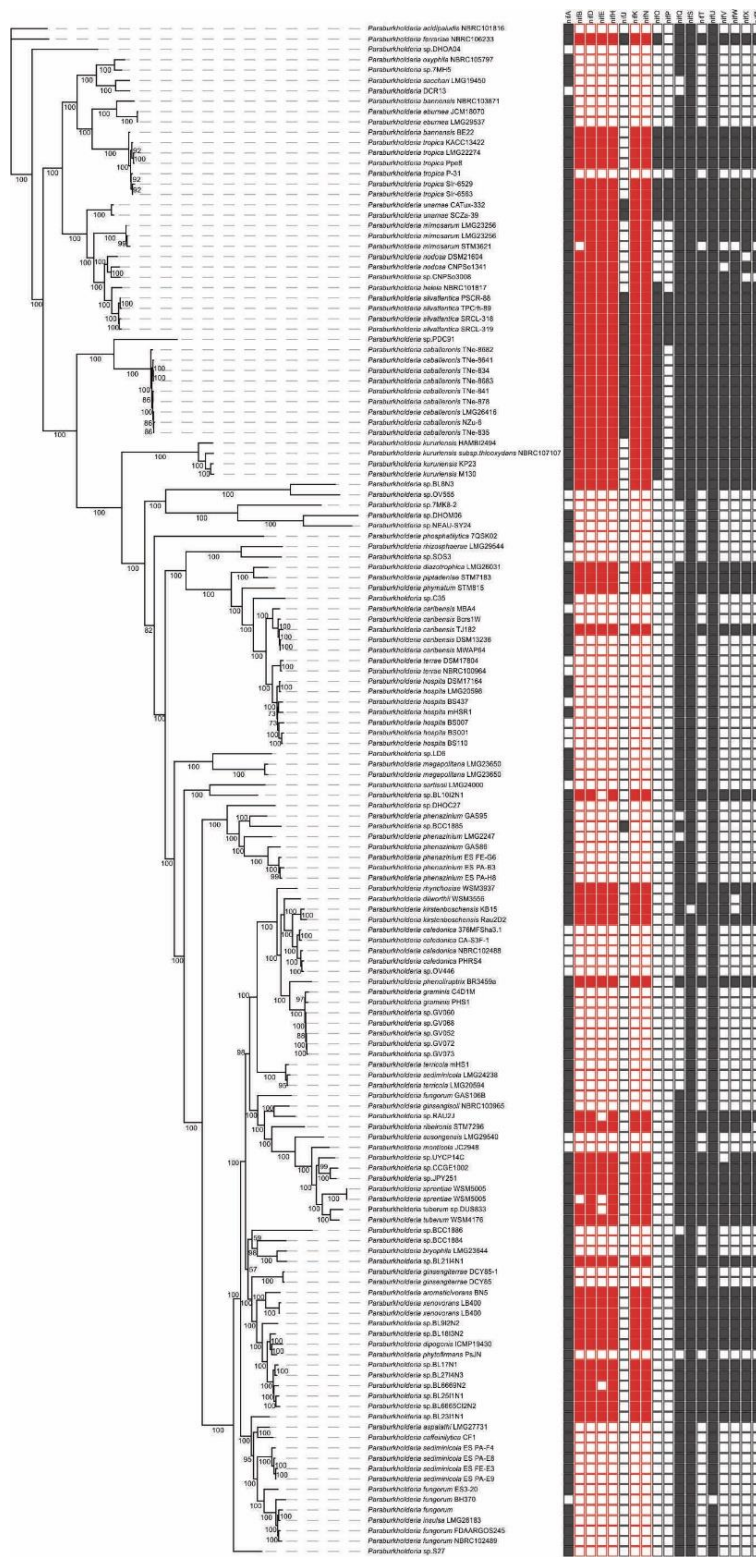
A reconstrução filogenética dos genomas pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* foi com os 443 *core* genes preditos na análise de pangenoma. Foram identificados 16 genes *nif* em *Herbaspirillum* (Figura 12), sendo que apenas 12 isolados apresentaram os principais genes do complexo da nitrogenase. Estes isolados pertencem às espécies *H. seropedicae*, *H. frisingense* e ao fitopatógeno *H. rubrisubalbicans*. Os genes *nifJ*, *nifF*, *nifL*, *nifM* e *nifY* não foram localizados nos genomas do gênero.

Em 2019, Faoro e colaboradores reportaram análises comparativas de genomas clínicos e ambientais de *H. seropedicae* e propuseram a perda de genes *nif* pelas cepas clínicas como um mecanismo de adaptação à diferentes hospedeiros. Entretanto, observamos em nosso trabalho que a maioria dos isolados de *Herbaspirillum*, mesmo aqueles associados às plantas, não apresentaram os genes que compõem o complexo da nitrogenase.



**Figura 12. Presença e ausência de 16 genes *nif* em 47 espécies de *Herbaspirillum*.** Células vermelhas e cinzas representam a presença de *nif*HDKENB e de outros genes *nif*, enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma *core* (443 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de *bootstrap*.

O pangenoma do gênero *Paraburkholderia* foi inferido a partir de 148 genomas, que resultou em 558 *core* genes usados na reconstrução filogenética (figura 13). Embora o gênero seja constituído por cepas majoritariamente ambientais oriundas do solo e em associação com plantas, apenas em 64 genomas foram localizados os principais genes relacionados a FBN (*nif*HDKENB). A presença dos genes *nif*O e *nif*P varia entre os genomas, embora exista prevalência em cepas isoladas de gramíneas como *P. unamae*, *P. tropica* e *P. silvatlantica*. Os genes *nif*F, *nif*L, *nif*M e *nif*Y não foram localizados em *Paraburkholderia*.



**Figura 13. Presença e ausência de 18 genes *nif* em 148 espécies de *Paraburkholderia*.** Células vermelhas e cinzas representam a presença de *nif*HDKENB e de outros genes *nif*, enquanto que as células brancas indicam a ausência dos genes. A árvore filogenética do genoma *core* (558 de genes) foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de *bootstrap*.

### 4.3.3 Análise filogenética comparativa

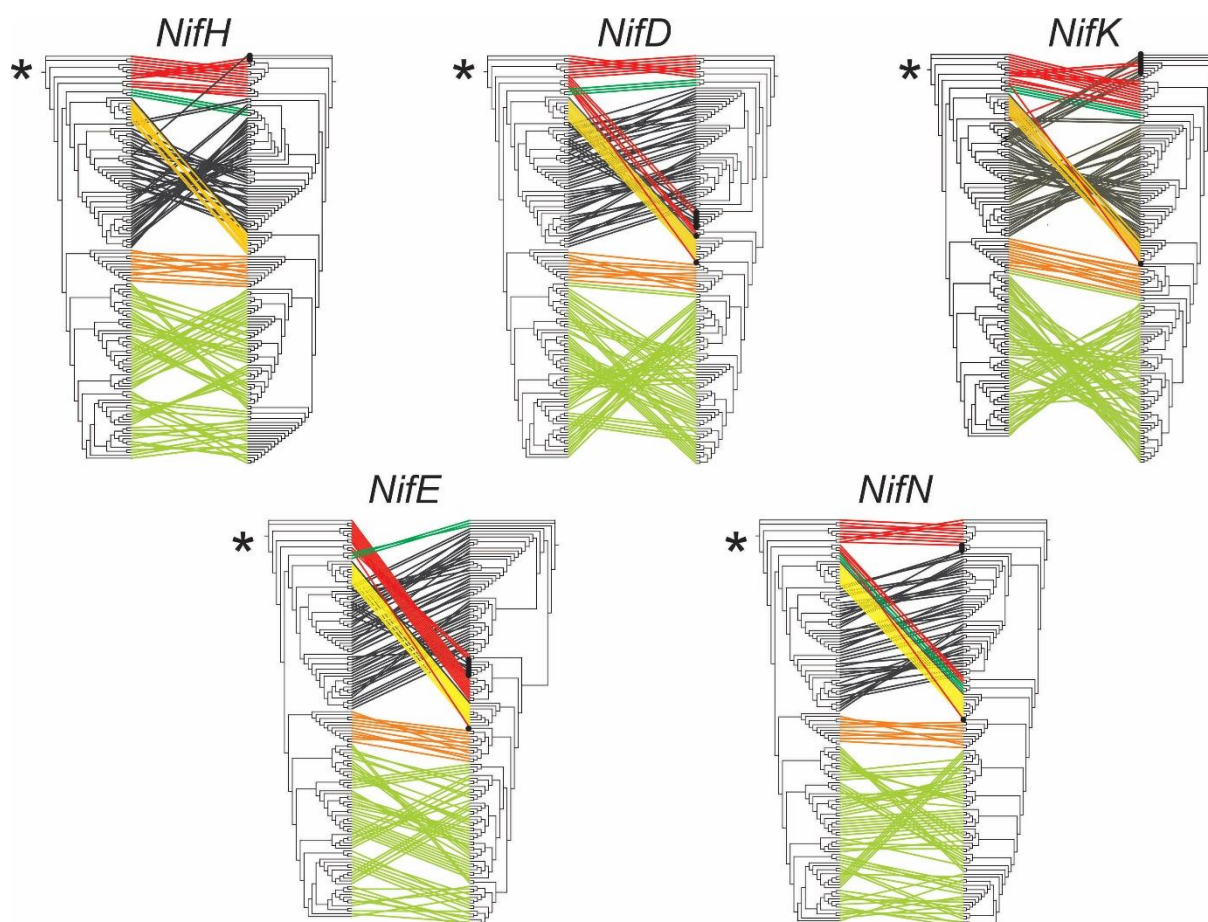
Dos 279 genomas analisados apenas 147 possuem os principais genes da nitrogenase (*nif*HDKENB), que foram selecionados para as análises subsequentes, descritas a seguir.

A metodologia para comparar topologias é baseada na ideia de que a transferência horizontal de genes introduz diferenças significativas na árvore filogenética desses genes. Quando não há diferença na topologia das árvores de dois genes, pressupõe-se que eles não estejam envolvidos em eventos de transferência horizontal, ou tenham sido transferidos juntos (Karasev *et al.*, 2017).

A análise foi realizada com os genomas que apresentaram mais de uma cópia dos genes *nif* (Figura 14). Alguns genomas apresentaram duas cópias do agrupamento principal de genes. Os genomas de *Azoarcus* sp. CCYHH838, *Azoarcus* sp. CCYHH848, *Azoarcus* sp. KH32C, *Azospirillum* sp. TSO22-1, *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* BR11005, *A. brasilense* BR12001 e *A. brasilense* BR11796 apresentaram duas cópias dos genes *nifD* e *nifK*. Todos estes genomas, exceto o *Azoarcus* sp. CCYHH838, apresentaram ainda uma segunda cópia de *nifE*. Outra cópia de *nifN* foi encontrada nos em *Azoarcus* sp. CCYHH848, *Azoarcus* sp. KH32C, *Azospirillum* sp. TSO22-1 e *A. brasilense* BR11796. E apenas os genomas de *Azoarcus* apresentaram duas cópias de *nifH*.

Foi possível ainda observar que as cópias dos genes formaram um novo clado em todas as árvores de genes. A cópia dos *nifD*, *nifK*, *nifE* e *nifN* de *Azoarcus* sp. KH32C se distanciou do clado do gênero e está próxima dos genomas de *Herbaspirillum*, todos na mesma posição. Também pode-se observar que os genomas pertencentes a *Gluconacetobacter*, *Nitrospirillum*, *Herbaspirillum* e *Paraburkholderia* apresentaram similaridade na topologia da árvore filogenética dos genes *nif*HDKEN com a árvore de *core* genoma.

Todos isolados de *Azoarcus* apresentaram as duas cópias do conjunto de genes no cromossomo. Em contrapartida, nos genomas de *Azospirillum* a segunda cópia do agrupamento é plasmidial e codifica uma nitrogenase alternativa (i.e. Fe-V).



**Figura 14. Comparação da topologia da árvore filogenética dos genes *nifHDKEN* com a árvore de core genome dos gêneros em estudo.** Os genomas dos gêneros com a presença dos genes *nif* estão separados pelas cores vermelho (*Azoarcus*), verde-escuro (*Gluconacetobacter*), amarelo (*Nitrospirillum*), cinza (*Azospirillum*), laranja (*Herbaspirillum*) e verde-claro (*Paraburkholderia*). Marcações na cor preta estão na árvore de gene (à direita) para representar as cópias. (\*) Árvore filogenética utilizando 7 *core* genes foi reconstruída usando o método de máxima verossimilhança com 1.000 replicatas de *bootstrap*. As árvores filogenéticas dos genes foram construídas usando o método de máxima verossimilhança com o modelo de matriz LG+F+R8. *Bootstrap* calculado com 1.000 replicatas.

#### 4.4 Predição *in silico* da estrutura dos operons

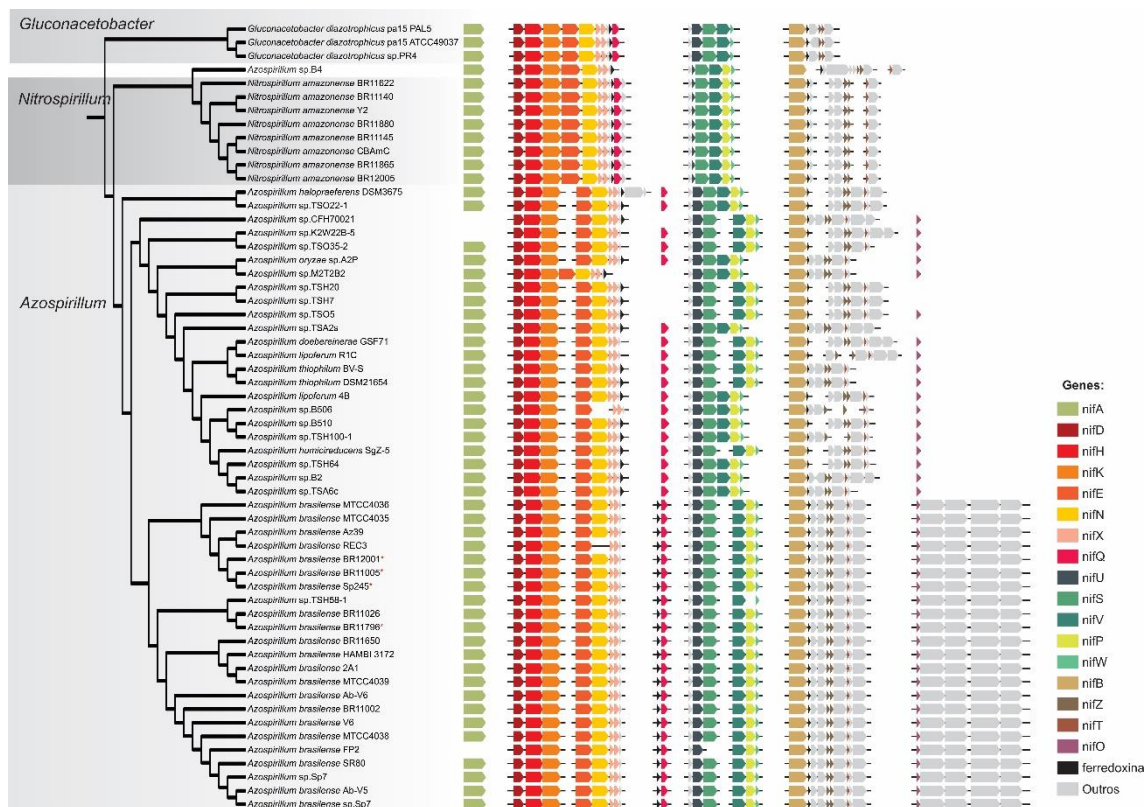
Operons são unidades essenciais de transcrição em bactérias. Identificar operons, portanto, é um passo importante no entendimento da regulação transcricional nestes organismos. A identificação de operons também auxilia na predição funcional de genes e em outras análises computacionais, como por exemplo a predição de elementos regulatórios (Osbourn e Field, 2009).

Através da predição de operons pelo Operon-mapper, foi possível recuperar os operons contendo genes *nif*. A integração das estruturas dos operons de cada genoma pode ser visualizada nas figuras 15 e 16. Para facilitar a interpretação, os genomas foram divididos acordo com as classes alpha e betaproteobacteria.

Dentro da classe de Alphaproteobacteria, os genomas de *Gluconacetobacter* apresentaram 4 operons conservados. Já as espécies do gênero *Nitrospirillum* apresentaram 6 operons preditos, enquanto genomas de *Azospirillum* variaram entre 6 a 9 operons de genes *nif*. Dentre os isolados de *Azospirillum*, todos os genomas de *A. brasilense* apresentaram o operon *nifO*, que contém 4 genes anotados como proteínas reguladoras de resposta. *nifO* possui um papel na regulação simultânea da nitrogenase e da nitrato redutase, que faz a redução do nitrato a nitrito no processo de assimilação do N do solo (Rubio e Ludden, 2008). A presença de genes reguladores de resposta pode estar atribuída na sensibilidade da atividade de *nifO* durante o processo de FBN.

O operon *nifBZT*, responsável pela síntese do co-FeMo, apresentou-se mais conservado em isolados de *A. brasilense* e *Gluconacetobacter*. Mesmo presente em diferentes operons de *A. brasilense* e *Nitrospirillum*, todos os genes auxiliares e associados à síntese do co-FeMo também foram preditos.

Embora os genomas de Alphaproteobacteria não tenham os genes *nifF* e *nifJ* (doadores de elétrons da proteína Fe), a predição de operons permitiu a identificação de genes codificadores de ferredoxinas em todos os genomas, que poderiam cumprir o papel na transferência de elétrons. Em linha com esta observação, alguns estudos demonstraram que mutações em alguns genes *nif*, como *nifY*, *nifT*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifM* e *nifQ*, não extinguem a atividade da nitrogenase por completo. Foi sugerido que estes genes poderiam ter suas funções supridas por homólogos dentro do genoma, que forneceriam suporte para a biossíntese de nitrogenase (Masson-Boivin *et al.*, 2009; Li e Chen, 2020).

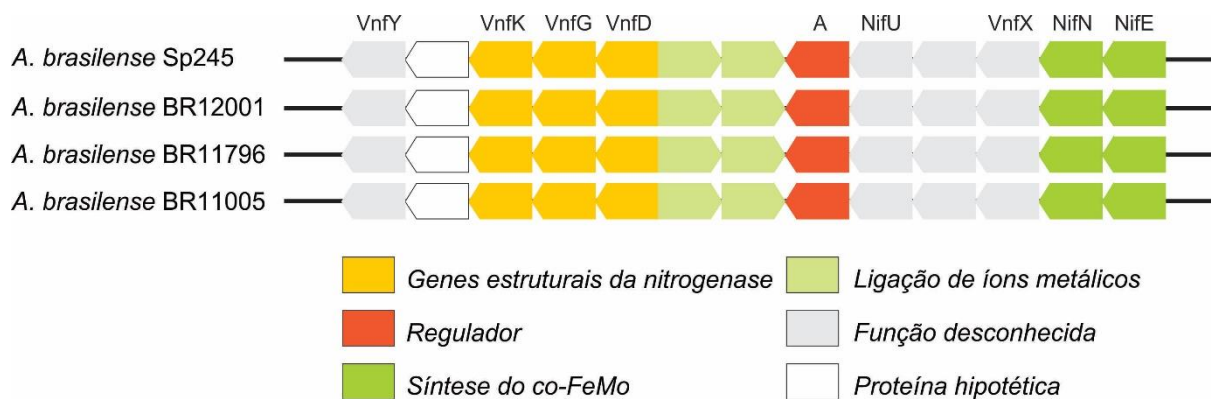


**Figura 15.** Operons *nif* pertencentes aos genomas de isolados diazotróficos dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Nitrospirillum* e *Azospirillum*.

Na classe Betaproteobacteria, de *Azoarcus* apresentaram de 9 a 13 operons preditos. Em *Herbaspirillum*, a predição de operons de genes *nif* resultou na variação de 4 a 7 operons, enquanto os genomas de *Paraburkholderia* apresentaram variação de 7 a 11 operons. Dos gêneros analisados, *Azoarcus* é o único que detém espécies com o operon *nifLA*. Betaproteobacteria também possui isolados com múltiplos operons *nifUS* e alguns genomas de *Paraburkholderia* apresentaram o operon *nifJ*. NifU e NifS fornecem, separadamente, o Fe e S necessários para a maturação da nitrogenase. Um estudo realizado por Li e colaboradores (2016) relataram que *nifFJ* e o *nifSU* podem aumentar significativamente a atividade da nitrogenase, que a montagem combinada dos genes codificadores de potenciais transportadores de elétrons de *Paenibacillus* (*pfoABfIdA*) com *K. oxytoca nifSU* recuperou 50,1% da atividade da nitrogenase.



montagem alternativas de cofatores de nitrogenase, sugerindo que os três sistemas enzimáticos compartilham várias características comuns (Mus *et al.*, 2018).



**Figura 17.** Operons da nitrogenase alternativa em plasmídeos de *A. brasilense*.

## 5. CONCLUSÃO

- Por meio da análise de ANI, foi possível identificar genomas que provavelmente necessitam de reclassificação filogenética por apresentarem alta similaridade com espécies distintas.
- Através da análise filogenética comparativa foi possível observar através da topologia que as cópias dos genes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE* e *nifN* formaram um novo clado em todas as árvores filogenéticas de genes demonstrando que essas cópias de genes podem ter sido adquiridas através de transferência horizontal.
- Os genomas de Alphaprotobacteria apresentaram estruturas de operons *nif* mais conservadas, o que poderia sugerir a maior similaridade intragênero.
- Os principais genes *nif* (*nifHDKENB*) se mostraram mais conservados em *operons* em todos os genomas, o que poderia estar relacionado com a necessidade de co-expressão refinada e estequiometricamente balanceada das subunidades do complexo da nitrogenase para a efetiva FBN.
- Análises comparativas como as realizadas neste trabalho abrem caminho para a identificação de estruturas de operons selecionadas, que podem ser usadas como arcabouço para a geração de microrganismos geneticamente modificados que tenham maior rendimento na FBN.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in microbiology**, v. 15, n. 3, p. 135-141, 2007. ISSN 0966-842X.
- ALBRIGHT, M. B. et al. Comparative genomics of nitrogen cycling pathways in bacteria and archaea. **Microbial ecology**, v. 77, n. 3, p. 597-606, 2019. ISSN 0095-3628.
- ALIBHAI, M.; VILAFRANCA, J. J. Kinetic and mutagenic studies of the role of the active site residues Asp-50 and Glu-327 of Escherichia coli glutamine synthetase. **Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 682-686, 1994. ISSN 0006-2960.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997. ISSN 0305-1048.
- ANGEL, R. et al. Evaluation of Primers Targeting the Diazotroph Functional Gene and Development of NifMAP - A Bioinformatics Pipeline for Analyzing nifH Amplicon Data. **Front Microbiol**, v. 9, p. 703, 2018. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29760683> >.
- ARNOLD, W. et al. Nucleotide-sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen-fixation gene-cluster of Klebsiella-Pneumoniae. **Journal of molecular biology**, v. 203, n. 3, 1988. ISSN 0022-2836.
- BAILEY-SERRES, J. et al. Genetic strategies for improving crop yields. **Nature**, v. 575, n. 7781, p. 109-118, 2019. ISSN 1476-4687.
- BALDANI, J. et al. Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986. ISSN 1466-5034.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soit Bidt. Biochem.**, v. 29, 1997.
- BERNABEU, P. R. et al. Assessment of bacterial inoculant formulated with Paraburkholderia tropica to enhance wheat productivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 81, 2018. ISSN 0959-3993.
- BERTALAN, M. et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 450, Sep 23 2009. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775431> >.
- BOYD, E. et al. A late methanogen origin for molybdenum-dependent nitrogenase. **Geobiology**, v. 9, n. 3, p. 221-232, 2011. ISSN 1472-4677.
- BOYD, E. S.; PETERS, J. W. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. **Front Microbiol**, v. 4, p. 201, 2013. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935594> >.
- BUENO BATISTA, M.; DIXON, R. Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 2, p. 603-614, 2019. ISSN 0300-5127.
- BUREN, S. et al. Biosynthesis of Nitrogenase Cofactors. **Chem Rev**, v. 120, n. 12, p. 4921-4968, Jun 24 2020. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31975585> >.
- BURÉN, S.; RUBIO, L. M. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 2, p. fnx274, 2018. ISSN 1574-6968.

- CAPONE, D. G. et al. **Nitrogen in the marine environment**. Elsevier, 2008. ISBN 0080558925.
- CATANHO, M. et al. Análise Comparativa de Genomas Procarióticos. 2007. ISSN 1414-6347.
- CHAUDHARI, N. M.; GUPTA, V. K.; DUTTA, C. BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. **Sci Rep**, v. 6, p. 24373, Apr 13 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27071527> >.
- CHEN, M.-H. et al. *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3755-3761, 2013. ISSN 1466-5026.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Organisation of the S10, spc and alpha ribosomal protein gene clusters in prokaryotic genomes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 242, n. 1, p. 117-26, Jan 1 2005. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621428> >.
- CURATTI, L.; LUDDEN, P. W.; RUBIO, L. M. NifB-dependent in vitro synthesis of the iron–molybdenum cofactor of nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 14, p. 5297-5301, 2006. ISSN 0027-8424.
- DIAZ, R. J.; ROSENBERG, R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. **science**, v. 321, n. 5891, p. 926-929, 2008. ISSN 0036-8075.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 8, p. 621-31, Aug 2004. ISSN 1740-1526 (Print) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15263897> >.
- DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, v. 1, p. 2-3, 1997.
- DOS SANTOS, P. C. et al. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC Bioinformatics**, v. 13, 2012.
- DUVAL, S. et al. Electron transfer precedes ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 41, p. 16414-16419, 2013. ISSN 0027-8424.
- EDGAR, R. **Usearch**. Lawrence Berkeley National Lab.(LBNL), Berkeley, CA (United States). 2010
- FAORO, H. et al. Genome comparison between clinical and environmental strains of *Herbaspirillum seropedicae* reveals a potential new emerging bacterium adapted to human hosts. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 630, 2019. ISSN 1471-2164.
- FRANS, J. et al. Regulation of nitrogen fixation and assimilation genes in the free-living versus symbiotic state. In: (Ed.). **Nitrogen Fixation**: Springer, 1990. p.33-44.
- FU, G.-Y. et al. *Azoarcus pumilus* sp. nov., isolated from seawater in Sanya, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 69, n. 5, p. 1459-1464, 2019. ISSN 1466-5026.
- GRAZZIOTIN, A. L.; VIDAL, N. M.; VENANCIO, T. M. Uncovering major genomic features of essential genes in Bacteria and a methanogenic Archaea. **FEBS J**, v. 282, n. 17, p. 3395-3411, Sep 2015. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26084810> >.
- GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 117-126, 2001. ISSN 0168-1656.
- HANSEN, A. P. et al. **Rhizobium Biology and Biotechnology**. Springer, 2017. ISBN 3319649825.

- HARDISON, R. C. Comparative genomics. **PLoS Biol**, v. 1, n. 2, p. e58, 2003. ISSN 1545-7885.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol**, v. 16, n. 10, p. 463-71, Oct 2008. ISSN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789693> >.
- HARLAN, J. R. **Crops and man**. American Society of Agronomy, 1992. ISBN 0891181075.
- HARRIS, D. F. et al. Mechanism of N<sub>2</sub> reduction catalyzed by Fe-nitrogenase involves reductive elimination of H<sub>2</sub>. **Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 701-710, 2018. ISSN 0006-2960.
- HOFFMAN, B. M. et al. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041-4062, 2014. ISSN 0009-2665.
- HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 2, p. 251-283, 2013. ISSN 1574-6976.
- HUERGO, L. F.; DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 79, n. 4, p. 419-35, Dec 2015. ISSN 1098-5557 (Electronic) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424716> >.
- JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7. 7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12782-12794, 1998. ISSN 0006-2960.
- JOERGER, R. et al. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 2, p. 1075-1086, 1989. ISSN 0021-9193.
- KANEKO, T. et al. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. **DNA Res**, v. 17, n. 1, p. 37-50, Feb 2010. ISSN 1756-1663 (Electronic) 1340-2838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047946> >.
- KARASEV, E. et al. Comparative phylogenetic analysis of symbiotic genes of different nodule bacteria groups using the metatrees method. **Agric. Biol**, v. 52, p. 995-1003, 2017.
- KRAUSE, A. et al. Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 11, p. 1385-91, Nov 2006. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057704> >.
- KRAWCZYK, P. S.; LIPINSKI, L.; DZIEMBOWSKI, A. PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. **Nucleic acids research**, v. 46, n. 6, p. e35-e35, 2018. ISSN 0305-1048.
- LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiol Res**, v. 169, n. 1, p. 2-17, Jan 20 2014. ISSN 1618-0623 (Electronic) 0944-5013 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157054> >.
- LATHE III, W. C.; SNEL, B.; BORK, P. Gene context conservation of a higher order than operons. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 10, p. 474-479, 2000. ISSN 0968-0004.
- LEDBETTER, R. N. et al. The electron bifurcating FixABCX protein complex from *Azotobacter vinelandii*: generation of low-potential reducing equivalents for nitrogenase catalysis. **Biochemistry**, v. 56, n. 32, p. 4177-4190, 2017. ISSN 0006-2960.
- LEE, C. C.; HU, Y.; RIBBE, M. W. Unique features of the nitrogenase VFe protein from *Azotobacter vinelandii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 23, p. 9209-9214, 2009. ISSN 0027-8424.

- LI, Q.; CHEN, S. Transfer of nitrogen fixation (nif) genes to non-diazotrophic hosts. **ChemBioChem**, 2020. ISSN 1439-7633.
- LI, X. X. et al. Using synthetic biology to increase nitrogenase activity. **Microb Cell Fact**, v. 15, p. 43, Feb 20 2016. ISSN 1475-2859 (Electronic) 1475-2859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897628> >.
- LIN, S.-Y. et al. Azospirillum soli sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4601-4607, 2015. ISSN 1466-5026.
- LIN, S.-Y. et al. 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**, v. 105, n. 6, p. 1149-1162, 2014. ISSN 0003-6072/1572-9699.
- LIU, H.-W. et al. Comparative genome analysis on intraspecific evolution and nitrogen fixation of Leptospirillum ferriphilum isolates. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 30, n. 6, p. 1635-1646, 2020. ISSN 1003-6326.
- MACNEIL, T. et al. Fine-structure mapping and complementation analysis of nif (nitrogen fixation) genes in Klebsiella pneumoniae. **Journal of Bacteriology**, v. 136, n. 1, p. 253-266, 1978. ISSN 0021-9193.
- MARTINEZ-ARGUDO, I. et al. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601-610, 2004. ISSN 0021-9193.
- MASSON-BOIVIN, C. et al. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in microbiology**, v. 17, n. 10, p. 458-466, 2009. ISSN 0966-842X.
- MERRICK, M.; EDWARDS, R. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 604-622, 1995. ISSN 0146-0749.
- MONTEIRO, F. et al. A luminescent reporter evidences active expression of Ralstonia solanacearum type III secretion system genes throughout plant infection. **Microbiology**, v. 158, n. 8, p. 2107-2116, 2012. ISSN 1350-0872.
- MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- MOREIRA, L. Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. **Moreira, LM & Varani, AM Plasticidade e fluxo genômico. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, v. 1, p. 101-116, 2015.
- MOURE, V. R. et al. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279-286, 2013. ISSN 0021-9193.
- MUS, F. et al. Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. **Metallomics**, v. 10, n. 4, p. 523-538, 2018.
- MUS, F. et al. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, Jul 1 2016. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084023> >.
- MYLONA, P. V. et al. Characteristics of orf1 and orf2 in the anfHDGK genomic region encoding nitrogenase 3 of Azotobacter vinelandii. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 204-208, 1996. ISSN 0021-9193.

- NEVES, M. C. P. et al. Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio em plantas. **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**, p. 127-167, 1993.
- ODA, Y. et al. Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 22, p. 7784-7794, 2005. ISSN 0021-9193.
- OLDROYD, G. E.; DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. **Curr Opin Biotechnol**, v. 26, p. 19-24, Apr 2014. ISSN 1879-0429 (Electronic) 0958-1669 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24679253> >.
- OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996. ISSN 0178-2762.
- OREN, A.; GARRITY, G. M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2017-2025, 2015. ISSN 1466-5026/1466-5034.
- OSBOURN, A. E.; FIELD, B. Operons. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 23, p. 3755-3775, 2009. ISSN 1420-682X.
- PINGALI, P. L. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12302-12308, 2012. ISSN 0027-8424.
- PRASAD, D. V.; MADHUSUDANAN, S.; JAGANATHAN, S. uCLUST-A NEW ALGORITHM FOR CLUSTERING UNSTRUCTURED DATA. 2006.
- PRATAMA, A. A.; CHAIB DE MARES, M.; VAN ELSAS, J. D. Evolutionary History of Bacteriophages in the Genus *Paraburkholderia*. **Front Microbiol**, v. 9, p. 835, 2018. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867788> >.
- PRICE, M. N.; ARKIN, A. P.; ALM, E. J. The life-cycle of operons. **PLoS Genet**, v. 2, n. 6, p. e96, Jun 2006. ISSN 1553-7404 (Electronic) 1553-7390 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789824> >.
- PRITCHARD, L. et al. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 12-24, 2016. ISSN 1759-9660/1759-9679.
- RAMACHANDRAN, V. K. et al. Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. **Genome biology**, v. 12, n. 10, p. R106, 2011. ISSN 1474-760X.
- RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Mol Biol Evol**, v. 21, n. 3, p. 541-54, Mar 2004. ISSN 0737-4038 (Print) 0737-4038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14694078> >.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. The Genera *Azoarcus*, *Azovibrio*, *Azospira* and *Azonexus*. p. 873-891, 2006.
- REINHOLD-HUREK, B. et al. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 574-584, 1993. ISSN 1466-5034.
- ROBERTS, G. P. et al. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 136, n. 1, p. 267-279, 1978. ISSN 0021-9193.

- ROULI, L. et al. The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. **New microbes and new infections**, v. 7, p. 72-85, 2015. ISSN 2052-2975.
- RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annu Rev Microbiol**, v. 62, p. 93-111, 2008. ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429691> >.
- RYU, M.-H. et al. Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 314-330, 2020. ISSN 2058-5276.
- SALGADO, H. et al. Operons in Escherichia coli: genomic analyses and predictions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 12, p. 6652-7, Jun 6 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823905> >.
- SETUBAL, J. C. et al. Genome sequence of Azotobacter vinelandii, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 14, p. 4534-4545, 2009. ISSN 0021-9193.
- SHAH, V. K. et al. In vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Purification and characterization of NifB cofactor, the product of NIFB protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1154-1158, 1994. ISSN 0021-9258.
- SICKERMAN, N. S. et al. Cluster assembly in nitrogenase. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 271-279, 2017. ISSN 0071-1365.
- SIMMONDS, J. **Community matters: A history of biological nitrogen fixation and nodulation research, 1965 to 1995**. Rensselaer Polytechnic Institute, 2007. ISBN 054945506X.
- SIPPEL, D.; EINSLE, O. The structure of vanadium nitrogenase reveals an unusual bridging ligand. **Nature chemical biology**, v. 13, n. 9, p. 956-960, 2017. ISSN 1552-4469.
- SONG, B. et al. Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of Azoarcus toluvorans sp. nov. and Azoarcus toluclasticus sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1129-1140, 1999. ISSN 1466-5034.
- STOKSTAD, E. **The nitrogen fix**: American Association for the Advancement of Science 2016.
- SWITZER, A.; BROWN, D. R.; WIGNESHWERARAJ, S. New insights into the adaptive transcriptional response to nitrogen starvation in Escherichia coli. **Biochem Soc Trans**, v. 46, n. 6, p. 1721-1728, Dec 17 2018. ISSN 1470-8752 (Electronic) 0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30514772> >.
- 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. **Canadian journal of microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978. ISSN 0008-4166.
- TETTELIN, H. et al. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 472-477, 2008. ISSN 1369-5274.
- TRIPLETT, E. W. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. **Plant and Soil**, v. 186, n. 1, p. 29-38, 1996. ISSN 0032-079X.
- VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; BOOGERD, F. C. Nitrogen assimilation in Escherichia coli: putting molecular data into a systems perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 628-695, 2013. ISSN 1092-2172.
- VAN OVERBEEK, L. S. et al. The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of Ralstonia solanacearum biovar 2. **Phytopathology**, v. 94, n. 5, p. 463-469, 2004. ISSN 0031-949X.

- VELASCO-BEDRÁN, H.; LÓPEZ-ISUNZA, F. The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1180-1190, 2007. ISSN 1359-5113.
- VERNIKOS, G. et al. Ten years of pan-genome analyses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 148-154, 2015/02/01/ 2015. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527414001830> >.
- VICENTE, E. J.; DEAN, D. R. Keeping the nitrogen-fixation dream alive. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 12, p. 3009-3011, Mar 21 2017. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28283657> >.
- WACKER, T. et al. Direct observation of electrogenic NH<sub>4</sub>(+) transport in ammonium transport (Amt) proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 27, p. 9995-10000, Jul 8 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958855> >.
- WAUGH, S. I. et al. The genes encoding the delta subunits of dinitrogenases 2 and 3 are required for mo-independent diazotrophic growth by *Azotobacter vinelandii*. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 6, p. 1505-1510, 1995. ISSN 0021-9193.
- WOESE, C.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. Hacia un sistema natural de organismos: propuesta para los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.
- YAMADA, Y.; HOSHINO, K.-I.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997. ISSN 0916-8451.
- YANG, Y. et al. *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 3676-3681, 2019. ISSN 1466-5026.
- YOKONO, M.; SATOH, S.; TANAKA, A. Comparative analyses of whole-genome protein sequences from multiple organisms. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018. ISSN 2045-2322.
- ZHOU, J. et al. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth of toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 45, n. 3, p. 500-6, Jul 1995. ISSN 0020-7713 (Print) 0020-7713 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8590677> >.

## 7. APÊNDICE

**7.1 – Genomas pertencentes ao gênero *Azoarcus* utilizados na análise.** Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica.

Organismo	Estirpe	RefSeq assembly accession	Tamanho (Mb)	Fonte de isolamento	Referência
<i>A. sp.</i> BH72	BH72	GCF_000061505.1	4,37604	Raízes de gramíneas (Kallar grass)	(Hurek <i>et al.</i> , 1994)
<i>A. olearius</i>	DQS4	GCF_001682385.1	4,45175	Solo contaminado com óleo	(Faoro <i>et al.</i> , 2017)
<i>A. communis</i>	TSPY31	GCF_003111645.1	4,57208	Solo contaminado com óleo	(Kim <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. communis</i>	TSNA42	GCF_003111665.1	4,88693	Solo contaminado com óleo	(Kim <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. sp.</i> KH32C	KH32C	GCF_000349945.1	5,81876	Solo agrícola com rotação de culturas	(Nishizawa <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. sp.</i> CIB	CIB	GCF_001190925.1	5,25703	Aquífero contaminado com combustível diesel	(Martin-Moldes <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. sp.</i> SY39	SY39	GCF_002872475.1	3,22551	Água do mar	NCBI
<i>A. sp.</i> DN11	DN11	GCF_003628555.1	4,95683	Lençóis freáticos	(Devanadera <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. sp.</i> PA01	PA01	GCF_001274695.1	3,90824	Estação de tratamento de águas residuais	(Junghare <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. communis</i>	SWub3	GCF_003226565.1	5,00469	Tecidos radiculares (Kallar grass)	(Zorraquino <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. indigenis</i>	DSM 12121	GCF_004361735.1	5.46447	Bases caulineares (Kallar grass - <i>Leptochloa fusca</i> )	(Reinhold-Hurek <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. sp.</i> DD4	DD4	GCF_006496635.1	5,400,077	Lamas de águas residuais de estação de tratamento	(Deng <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. sp.</i> CC-YHH838	CC-YHH838	GCF_004801295.1	4,723,750	Ninho de cupim	NCBI
<i>A. sp.</i> CC-YHH848	CC-YHH848	GCF_004801305.1	4,602,265	Rizosfera ( <i>Ficus religiosa</i> )	NCBI

**7.2 – Genomas pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum* utilizados na análise.** Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica.

Organismo	Estirpe	RefSeq assembly accession	Tamanho (Mb)	Fonte de isolamento	Referência
<i>A. brasilense</i>	Sp 7	GCF_001315015.1	6,58753	Raiz ( <i>Digitaria eriantha</i> )	(Tarrand <i>et al.</i> , 1978)
<i>A. brasilense</i>	Sp 7	GCF_002027385.1	7,08277	Raiz ( <i>Digitaria eriantha</i> )	(Tarrand <i>et al.</i> , 1978)
<i>A. brasilense</i>	Sp 7	GCF_007827425.1	7,030,811	Raiz ( <i>Digitaria eriantha</i> )	(Tarrand <i>et al.</i> , 1978)
<i>A. brasilense</i>	Az39	GCF_000632475.1	7,39128	Rizosfera de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	(Rivera <i>et al.</i> , 2014)
<i>A. brasilense</i>	MTCC4038	GCF_005222145.1	7,13417	Rizosfera de diferentes gramíneas	(Singh <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. brasilense</i>	MTCC4035	GCF_005222165.1	7,92866	Rizosfera de diferentes gramíneas	(Singh <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. brasilense</i>	MTCC4039	GCF_005222205.1	7,19625	Rizosfera de diferentes gramíneas	(Singh <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. brasilense</i>	MTCC4036	GCF_005222185.1	8,1211	Rizosfera de diferentes gramíneas	(Singh <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. brasilense</i>	REC3	GCF_002895265.1	7,22895	Raizes de morango	(Fontana <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. brasilense</i>	2A1	GCF_002245955.1	7,25781	Raizes de petúnia selvagem	NCBI
<i>A. brasilense</i>	V6	GCF_002027445.1	7,09252	Rizosfera vegetal	NCBI
<i>A. brasilense</i>	Ab-V5	GCF_002940725.1	6,93449	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	(Hungria <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. brasilense</i>	Ab-V6	GCF_002940755.1	7,1972	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	(Hungria <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. brasilense</i>	HAMBI_3172	GCF_003349955.1	7,13972	Raiz ( <i>Oryza sativa</i> )	(Cairns <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. brasilense</i>	SR80	GCF_003584185.1	7,14659	Mudas de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv Saratovskaya 49)	(Sigida <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. brasilense</i>	BR 12001	GCF_007827765.1	7,364,497	<i>Digitaria</i>	NCBI
<i>A. brasilense</i>	BR 11026	GCF_007827795.1	6,242,579	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	NCBI
<i>A. brasilense</i>	BR 11650	GCF_007827815.1	6,886,674	<i>Digitaria</i>	NCBI

<i>A. brasilense</i>	BR 11005	GCF_007827915.1	7,486,142	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	NCBI
<i>A. brasilense</i>	BR 11002	GCF_007828115.1	6,960,968	<i>Digitaria</i>	NCBI
<i>A. brasilense</i>	BR 11796	GCF_007828645.1	6,889,693	<i>Digitaria</i>	NCBI
<i>A. brasilense</i> FP2	FP2	GCF_000404045.1	6,88511	Mutante defeituoso de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 em componentes da nitrogenase	(Machado <i>et al.</i> , 1991)
<i>A. brasilense</i>	Sp245	GCF_000237365.1	7,53024	Rizosfera de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	(Bartolini <i>et al.</i> , 2017)
<i>A. brasilense</i>	Sp245	GCF_003119195.2	7,68239	Rizosfera de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	(Bartolini <i>et al.</i> , 2017)
<i>A. doebereineriae</i>	GSF71	GCF_003989665.1	7,00006	Raizes lavadas ( <i>Miscanthus sinensis</i> cv. "Giganteus")	(Eckert <i>et al.</i> , 2001)
<i>A. halopraeferens</i>	DSM 3675	GCF_000429625.1	6,51238	Rizosfera de sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> )	(Schenk e Werner, 1988)
<i>A. humicireducens</i>	SgZ-5	GCF_001639105.2	6,862,695	Célula a Combustível Microbiana (MFC)	(Zhou <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. lipoferum</i>	R1C	GCF_900177475.1	7,77069	Raizes de tabaco	NCBI
<i>A. lipoferum</i>	4B	GCF_000283655.1	6,8464	Rizosfera de arroz	(Prigent-Combaret <i>et al.</i> , 2008)
<i>A. oryzae</i>	A2P	GCF_900177515.1	7,67469	Solo	NCBI
<i>A. sp. B2</i>	B2	GCF_002573965.1	7,99749	Solo de pântano	(Grouzdev <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. sp. B4</i>	B4	GCF_000333275.1	7,34536	Raiz ( <i>Oryza alta</i> W0018)	(Elbeltagy <i>et al.</i> , 2000)
<i>A. sp. B506</i>	B506	GCF_000333595.1	7,2381	Caule de arroz ( <i>Oryza rufipogon</i> W1989)	(Elbeltagy <i>et al.</i> , 2001)
<i>A. sp. B510</i>	B510	GCF_000010725.1	7,59974	Caule de arroz ( <i>Oryza sativa</i> cv. <i>Nipponbare</i> )	(Kaneko <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. sp. CFH 70021</i>	CFH 70021	GCF_003130795.1	6,77631	Fonte termal	NCBI
<i>A. sp. K2W22B-5</i>	K2W22B-5	GCF_003590795.1	6,461	Água da caverna do carste	NCBI
<i>A. sp. L-25-5w-1</i>	L-25-5w-1	GCF_003966125.1	5,95138	Água do lago Baiyang	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. sp. M2T2B2</i>	M2T2B2	GCF_003233655.1	6,31626	Esterco bovino	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. sp. RU37A</i>	RU37A	GCF_900188305.1	6,13041	Microbioma aquático ( <i>Lemna</i> )	(Елькин <i>et al.</i> )
<i>A. sp. RU38E</i>	RU38E	GCF_900188385.1	6,12876	Microbioma aquático ( <i>Lemna</i> )	(Елькин <i>et al.</i> )

A. sp. Sp 7	Sp 7	GCF_003116055.1	7,09859	Raiz ( <i>Digitaria eriantha</i> )	(Tarrand <i>et al.</i> , 1978)
A. sp. TSA2s	TSA2S	GCF_004923315.1	8,10248	Solo de arrozal	(Gao, N. <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSA6c	TSA6c	GCF_003115895.1	8,34182	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSH100	TSH100	GCF_004923295.1	7,16638	Solo de arrozal	(Gao, N. <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSH100	TSH100	GCF_003115975.1	7,15373	Solo de arrozal	(Gao, N. <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSH20	TSH20	GCF_003115935.1	7,45508	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSH58	TSH58	GCF_003119115.1	7,24407	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSH58	TSH58	GCF_003115995.1	6,98287	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSH64	TSH64	GCF_003116035.1	7,90115	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSH7	TSH7	GCF_003115945.1	7,4476	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSO22-1	TSO22-1	GCF_003116015.1	7,35389	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSO35-2	TSO35-2	GCF_003116095.1	7,35204	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
A. sp. TSO5	TSO5	GCF_003116065.1	6,99813	Solo de arrozal	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. thiophilum</i>	BV-S	GCF_001305595.1	7,60946	Tapete microbiano	(Fomenkov <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. thiophilum</i>	DSM 21654	GCF_000960825.1	7,63752	Tapete microbiano	(Kwak e Shin, 2016)
<i>N. amazonense</i>	CBAmC	GCF_000730165.1	7,38239	Hastes esterilizadas superficialmente de cana de açúcar	(Schwab <i>et al.</i> , 2018)
<i>N. amazonense</i>	Y2	GCF_000225995.1	6,31841	Hastes esterilizadas superficialmente de cana de açúcar	(Schwab <i>et al.</i> , 2018)
<i>N. amazonense</i>	BR 11140	GCF_007827975.1	7,476,108	Brachiaria	NCBI
<i>N. amazonense</i>	BR 11145	GCF_007827935.1	7,289,358	Brachiaria	NCBI
<i>N. amazonense</i>	BR 11622	GCF_007827955.1	6,574,974	Brachiaria	NCBI
<i>N. amazonense</i>	BR 11865	GCF_007828025.1	7,030,307	Brachiaria	NCBI
<i>N. amazonense</i>	BR 12005	GCF_007828035.1	6,827,449	Brachiaria	NCBI
<i>N. amazonense</i>	BR 11880	GCF_007828045.1	7,090,921	Brachiaria	NCBI

**7.3 – Genomas pertencentes ao gênero *Gluconatobacter* utilizados na análise.** Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica.

<b>Organismo</b>	<b>Estirpe</b>	<b>RefSeq assembly accession</b>	<b>Tamanho (Mb)</b>	<b>Fonte de isolamento</b>	<b>Referência</b>
<i>G. diazotrophicus</i>	PAI 5; ATCC 49037	GCF_000021325.1	3,91495	Raízes de Cana de açúcar	(Giongo <i>et al.</i> , 2010)
<i>G. diazotrophicus</i>	PAI 5	GCF_000067045.1	3,99959	Raízes de Cana de açúcar	(Cavalcante e Dobereiner, 1988)
<i>G. liquefaciens</i>	NBRC 12388	GCF_006539085.1	4,16355	Frutos secos ( <i>Diospyros sp.</i> )	NCBI
<i>G. liquefaciens</i>	DSM 5603	GCF_003350405.1	4,17694	Frutos secos ( <i>Diospyros sp.</i> )	NCBI
<i>G. sp. SXCC-1</i>	SXCC-1	GCF_000208635.1	4,233,336	Fermentação de vinagre	(Du <i>et al.</i> , 2011)
<i>G. entanii</i>	LTH 4560	GCF_003206495.1	3,604,084	Fermentação submersa de vinagre de alto teor alcoólico	(Schüller <i>et al.</i> , 2000)
<i>G. diazotrophicus</i>	PR 4	GCF_007828635.1	3,818,448	Raízes de Cana de açúcar	NCBI

**7.4 – Genomas pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* utilizados na análise.** Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica.

Organismo	Estirpe	RefSeq assembly accession	Tamanho (Mb)	Fonte de isolamento	Referência
<i>H. aquaticum</i>	IEH 4430	GCF_002213425.1	5,42499	Água deionizada	(Dobritsa <i>et al.</i> , 2010)
<i>H. autotrophicum</i>	IAM 14942	GCF_001189915.1	6,00983	Água doce	(Ding e Yokota, 2004)
<i>H. chlorophenolicum</i>	CPW301	GCF_001189955.1	5,29701	Sedimentos do solo que foram coletados em riacho perto de uma região industrial	(Im <i>et al.</i> , 2004)
<i>H. chlorophenolicum</i>	NBRC 102525	GCF_001571165.1	5,29664	Sedimentos de solo	NCBI
<i>H. frisingense</i>	GSF30	GCF_000300975.2	5,40833	Várias gramíneas	(Straub <i>et al.</i> , 2013)
<i>H. hiltneri</i>	N3	GCF_001267925.1	4,96547	Raíz de trigo com a superfície esterilizada	(Guizelini <i>et al.</i> , 2015)
<i>H. huttiense</i>	IAM 15032	GCF_000478365.1	5,777,919	Água de poço	(De Souza <i>et al.</i> , 2013)
<i>H. huttiense</i>	AU6965 10_3	GCF_004366705.1	5,803,233	Solo	
<i>H. huttiense</i>	NFY 53159	GCF_004367745.1	5,691,775	Sangue ( <i>Homo sapiens</i> )	NCBI
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	GCF_000256565.1	4,90487	Nódulos radiculares ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	(Weiss <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. rhizosphaerae</i>	UMS-37	GCF_001189965.1	5,26611	Rizosfera ( <i>Allium victorialis</i> var. <i>Platyphyllum</i> )	(Jung <i>et al.</i> , 2007)
<i>H. robiniae</i>	AA6	GCF_002025725.1	5,44527	Raiz de milho	(Niu e Kolter, 2017)
<i>H. robiniae</i>	HZ10	GCF_002213415.1	5,53456	Nódulos radiculares ( <i>Robinia pseudoacacia</i> )	(Fan <i>et al.</i> , 2018)
<i>H. rubrisubalbicans</i>	DSM 11543	GCF_003719195.1	5,61759	Raiz ( <i>Saccharum officinalis</i> )	NCBI
<i>H. rubrisubalbicans</i>	Os38	GCF_003263475.1	5,93649	Raizes de arroz(Patogênico)	(Li <i>et al.</i> , 2011)
<i>H. rubrisubalbicans</i>	Os44	GCF_003263495.1	5,8258	Raizes de arroz(Patogênico)	(Li <i>et al.</i> , 2011)
<i>H. rubrisubalbicans</i>	M1	GCF_001483945.1	5,61126	Rizosfera de cana de açúcar (Fitopatogênico)	(Monteiro <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. rubrisubalbicans</i>	NBRC 102523	GCF_001591225.1	5,52019	<i>Saccharum officinalis</i>	(Baldani <i>et al.</i> , 1996)

<i>H. rubrisubalbicans</i>	Os34	GCF_000300435.1	6,15299	Raízes de arroz (Patogênico)	(Ye <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. rubrisubalbicans</i>	Os45	GCF_000300415.1	5,63315	Raízes de arroz (Patogênico)	(Zhu <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. seropedicae</i>	Z67	GCF_001040945.1	5,50972	Solo (milho / sorgo / arroz)	(Baldani <i>et al.</i> , 1986)
<i>H. seropedicae</i>	AU14040	GCF_001721865.1	5,41867	Pacientes com fibrose cística ( <i>Homo sapiens</i> )	(Faoro <i>et al.</i> , 2019)
<i>H. seropedicae</i>	AU13965	GCF_006378125.1	5,39297	Pacientes com fibrose cística ( <i>Homo sapiens</i> )	(Faoro <i>et al.</i> , 2019)
<i>H. seropedicae</i>	AG215	GCF_004366165.1	5,78309	Arroz	(Bertani <i>et al.</i> , 2016)
<i>H. seropedicae</i>	SmR1	GCF_000143225.1	5,51389	Gramíneas tropicais	(Pedrosa <i>et al.</i> , 2011)
<i>H. sp. 3C11</i>	3C11	GCF_004563825.1	5,55286	Nódulos radiculares ( <i>Alder</i> )	NCBI
<i>H. sp. 3R-11</i>	3R-11	GCF_004563895.1	5,21999	Nódulos radiculares ( <i>Alder</i> )	NCBI
<i>H. sp. 3R-3a1</i>	3R-3a1	GCF_003400355.1	5,22152	Nódulos radiculares ( <i>Alnus</i> )	NCBI
<i>H. sp. 3R11</i>	3R11	GCF_004563925.1	5,22116	Nódulos radiculares ( <i>Alder</i> )	NCBI
<i>H. sp. B39</i>	B39	GCF_000333495.1	5,30962	Raiz ( <i>Oryza meridionalis</i> WI627)	(Elbeltagy <i>et al.</i> , 2000)
<i>H. sp. B501</i>	B501	GCF_000333575.1	6,28457	Arroz ( <i>Oryza officinalis</i> )	(Elbeltagy <i>et al.</i> , 2001)
<i>H. sp. B65</i>	B65	GCF_000333555.1	5,78755	Arroz ( <i>Oryza officinalis</i> )	(Elbeltagy <i>et al.</i> , 2001)
<i>H. sp. BH-1</i>	BH-1	GCF_002870055.1	5,48929	Solo com biureto (fonte de nitrogênio)	(Robinson <i>et al.</i> , 2018)
<i>H. sp. CF444</i>	CF444	GCF_000282135.1	5,59473	Rizosfera e Endosfera ( <i>Populus deltoides</i> )	(Brown <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. sp. GW103</i>	GW103	GCF_000261365.1	5,04765	Solo da rizosfera ( <i>Phragmites australis</i> ) em áreas recuperadas	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. sp. K1R23-30</i>	K1R23-30	GCF_003591035.1	6,4954	Solo da caverna do carste	NCBI
<i>H. sp. K2R10-39</i>	K2R10-39	GCF_003590875.1	4,66475	Rocha da caverna do carste	NCBI
<i>H. sp. meg3</i>	meg3	GCF_002257565.1	5,4658	Solo	(Kim <i>et al.</i> , 2017)
<i>H. sp. RV1423</i>	RV1423	GCF_000577615.1	6,21086	Água subterrânea de um ambiente contaminado com hidrocarbonetos	(Jauregui <i>et al.</i> , 2014)

<i>H. sp. SJZ106</i>	SJZ106	GCF_006715495.1	4,57693	Solo da rizosfera	NCBI
<i>H. sp. SJZ107</i>	SJZ107	GCF_006715485.1	6,7245	Solo da rizosfera	NCBI
<i>H. sp. SJZ130</i>	SJZ130	GCF_006715445.1	4,57671	Solo da rizosfera	NCBI
<i>H. sp. ST 5-3</i>	ST 5-3	GCF_004804275.1	5,79872	Solo	NCBI
<i>H. sp. VT-16-41</i>	VT-16-41	GCF_001994935.1	5,83761	Cistite clínica ( <i>Homo sapiens</i> )	(Tetz e Tetz, 2017)
<i>H. sp. WT00C</i>	WT00C	GCF_001929405.1	6,07982	Chá ( <i>Camellia sinensis</i> L.)	(Cheng <i>et al.</i> , 2017)
<i>H. sp. XFZ15 10_5</i>	XFZ15 10_5	GCF_003634405.1	5,80399	Sorgo	NCBI
<i>H. sp. YR522</i>	YR522	GCF_000282575.1	5,11304	Rizosfera e Endosfera ( <i>Populus deltoides</i> )	(Brown <i>et al.</i> , 2012)

**7.5 – Genomas pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* utilizados na análise.** Nomeclatura, estirpe, código de acesso as sequências de referência, tamanho de cada genoma, fonte de isolamento e referência bibliográfica.

Organismo	Estirpe	RefSeq assembly accession	Tamanho (Mb)	Fonte de isolamento	Referência
<i>P. acidipaludis</i>	NBRC 101816	GCF_000684975.1	6,47543	Castanha-d'água ( <i>Eleocharis dulcis</i> )	(Aizawa, Bao Ve, <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. aromaticivorans</i>	BN5	GCF_002278075.1	8,90772	Solo contaminado com gasolina	(Lee e Jeon, 2018)
<i>P. aspalathi</i>	LMG 27731	GCF_900116445.1	9,89229	Nódulos radiculares ( <i>Aspalathus abietina</i> Thunb)	(Mavengere <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. bannensis</i>	BE22	GCF_003849705.1	7,22393	Rizosfera de milho	(Esmaeel <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. bannensis</i>	NBRC 103871	GCF_000685015.1	8,64877	Capim-torpedo ( <i>Panicum repens</i> L.)	(Aizawa <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. bryophila</i>	LMG 23644	GCF_003269035.1	8,0147	Pastagem e solo agrícola	(Vandamme <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. caballeronis</i>	TNe-841	GCF_900104845.1	7,11514	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. caballeronis</i>	TNe-878	GCF_003201435.1	7,06082	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. caballeronis</i>	TNe-835	GCF_003201635.1	7,05654	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Martinez-Aguilar <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. caballeronis</i>	NZu-6	GCF_003259875.1	7,05699	ND*	-
<i>P. caballeronis</i>	TNe-8682	GCF_004365245.1	7,09245	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. caballeronis</i>	TNe-834	GCF_004365795.1	6,89151	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. caballeronis</i>	TNe-8641	GCF_004366045.1	6,8933	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. caballeronis</i>	TNe-8683	GCF_004368685.1	6,89042	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Martinez-Aguilar <i>et al.</i> , 2013)

<i>P. caballeronis</i>	LMG 26416	GCF_900109675.1	7,06694	Rizosfera de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	(Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2017)
<i>P. caffeinilytica</i>	CF1	GCF_003368325.1	8,32464	Solo de uma plantação de chá	(Gao <i>et al.</i> , 2016)
<i>P. caledonica</i>	PHRS4	GCF_003330745.1	7,21116	Solo de uma plantação de beterraba	(Carrion <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. caledonica</i>	376MFSHa3.1	GCF_000383275.1	7,38182	Associado a musgo	(Pratama e Van Elsas, 2018)
<i>P. caledonica</i>	CA-S3F-1	GCF_002179925.1	7,58141	Pântano	NCBI
<i>P. caledonica</i>	NBRC 102488	GCF_000685095.1	7,28235	Solo da rizosfera	NCBI
<i>P. caribensis</i>	MWAP64	GCF_001449005.1	9,03212	Vertissolo sob pastagem permante ( <i>Digitaria decumbens</i> )	(Achouak <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. caribensis</i>	Bcrs1W	GCF_001611015.1	9,31999	Cultura mista para degradação de fenantreno	(Ohtsubo <i>et al.</i> , 2016)
<i>P. caribensis</i>	DSM 13236	GCF_002902945.1	9,03249	Vertissolo sob pastagem permante ( <i>Digitaria decumbens</i> )	(Achouak <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. caribensis</i>	TJ182	GCF_003028645.1	9,20567	Nódulos radiculares ( <i>Mimosa diplotricha</i> )	(Chen <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. caribensis</i>	MBA4	GCF_000522545.2	9,4827	Solo de floresta	(Pan <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. diazotrophica</i>	LMG 26031	GCF_900108945.1	8,68858	Nódulos radiculares ( <i>Mimosa candollei</i> )	(Sheu <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. dilworthii</i>	WSM3556	GCF_000472525.1	7,67907	Nódulos radiculares ( <i>Lebeckia ambigua</i> )	(De Meyer <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. dipogonis</i>	ICMP 19430	GCF_004402975.1	10,2635	Nódulos radiculares ( <i>Dipogon lignosus</i> )	(Sheu <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. eburnea</i>	JCM 18070	GCF_002917095.1	6,94798	Solo de turfa coletado perto de uma mina de carvão	(Kang <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. eburnea</i>	LMG 29537	GCF_003003375.1	6,95113	ND*	-
<i>P. ferrariae</i>	NBRC 106233	GCF_000685035.1	7,93864	Mina de ferro com alto teor de fósforo	(Valverde <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. fungorum</i>		GCF_000961515.1	9,05898	Fungo ( <i>Phanerochaete chrysosporium</i> )	NCBI
<i>P. fungorum</i>	FDAARGOS_245	GCF_002891075.1	9,00962	Fungo ( <i>Phanerochaete chrysosporium</i> )	NCBI
<i>P. fungorum</i>	ES3-20	GCF_003610895.1	8,88336	Solo	NCBI
<i>P. fungorum</i>	GAS106B	GCF_900099835.1	8,58117	Solo de floresta	NCBI
<i>P. fungorum</i>	BH370	GCF_900185605.1	8,950,957	Membrana sinovial do joelho de um paciente	(Loong <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. fungorum</i>	NBRC 102489	GCF_000685055.1	8,69621	Fungo ( <i>Phanerochaete chrysosporium</i> )	NCBI

<i>P. ginsengisoli</i>	NBRC 100965	GCF_000739735.1	6,54189	Solo de um campo com ginseng	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. ginsengiterrae</i>	DCY85	GCF_001645125.1	8,53304	Rizosfera de ginseng	(Farh <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. ginsengiterrae</i>	DCY85-1	GCF_001645135.1	8,48339	Rizosfera de ginseng	(Farh <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. graminis</i>	PHS1	GCF_003330785.1	7,50845	Solo de um campo agrícola de beterraba	(Carrion <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. graminis</i>	C4D1M	GCF_000172415.1	7,47726	Sistema radicular senescente de milho	(Viallard <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. heleia</i>	NBRC 101817	GCF_000739775.1	8,00747	Planta aquática ( <i>Eleocharis dulcis</i> )	(Aizawa, Ve, <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. hospita</i>	DSM 17164	GCF_002902965.1	11,5277	Solo	NCBI
<i>P. hospita</i>	mHSR1	GCF_003330805.1	10,8166	Solo	NCBI
<i>P. hospita</i>	BS001	GCF_000265115.1	11,2941	Solo com cogumelos ( <i>Laccaria proxima</i> )	(Nazir, R. <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. hospita</i>	BS110	GCF_002157285.1	11,1727	Solo com cogumelos ( <i>Lyophyllum sp. G</i> )	(Nazir, Rashid <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. hospita</i>	BS007	GCF_002157295.1	11,0199	Solo com cogumelos ( <i>Laccaria proxima</i> )	(Nazir, Rashid <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. hospita</i>	BS437	GCF_002157305.1	11,2977	Solo com cogumelos ( <i>Laccaria proxima</i> )	(Nazir, Rashid <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. hospita</i>	LMG 20598	GCF_900108355.1	11,2005	Horizonte B de um solo agrícola	(Goris <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. insulsa</i>	LMG 28183	GCF_003002115.1	9,62091	Sedimentos de uma área hidrotérmica de mar raso rica em arsênico	(Rusch <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. kirstenboschensis</i>	Rau 2D2	GCF_001636965.1	9,15075	Nódulos radiculares ( <i>Hypocalyptus coluteoides</i> )	(Steenkamp <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. kirstenboschensis</i>	KB15	GCF_001636975.1	8,34289	Nódulos radiculares ( <i>Virgilia oroboides</i> )	(Steenkamp <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. kururiensis</i>	KP23	GCF_003986935.1	7,52925	Aquífero poluído com tricloroetileno (TCE)	(Zhang <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. kururiensis</i>	HAMBI_2494	GCF_003350035.1	6,64839	Máquina de papel de impressão	(Cairns <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. kururiensis</i>	M130	GCF_000341045.1	7,12886	Raízes de arroz esterilizadas na superfície	(Coutinho <i>et al.</i> , 2013)

<i>P. kururiensis</i> subsp. <i>Thiooxydans</i>	NBRC 107107	GCF_000739795.1	6,79558	Solo da rizosfera de tabaco	(Anandham <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. megapolitana</i>	LMG 23650	GCF_900113825.1	7,60732	Pastagem e solo agrícola	(Vandamme <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. megapolitana</i>	LMG 23650	GCF_007556815.1	7,62759	Pastagem e solo agrícola	(Vandamme <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. mimosarum</i>	LMG 23256	GCF_000472825.1	8,41097	Nódulos ( <i>Mimosa pigra</i> )	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. mimosarum</i>	LMG 23256	GCF_000739815.1	8,49122	Nódulos ( <i>Mimosa pigra</i> )	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. mimosarum</i>	STM 3621	GCF_000472845.1	8,64028	Nódulos ( <i>Mimosa pudica</i> )	(Mishra <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. monticola</i>	JC2948	GCF_001580545.1	7,84538	Solo da montanha Gwanak	(Baek <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. nodosa</i>	CNPSo 1341	GCF_001718195.1	8,61403	Nódulos de feijão comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) em solos do cerrado brasileiro	(Dall'agnol <i>et al.</i> , 2016)
<i>P. nodosa</i>	DSM 21604	GCF_000519185.1	9,62797	Nódulos radiculares ( <i>Mimosa scabrella</i> )	NCBI
<i>P. oxyphila</i>	NBRC 105797	GCF_000685075.1	10,6477	Solo ácido florestal	(Otsuka <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. phenazinium</i>	ES_FE-G6	GCF_003693345.1	9,0525	Solo	NCBI
<i>P. phenazinium</i>	ES_PA-H8	GCF_003751885.1	8,57997	Solo	NCBI
<i>P. phenazinium</i>	ES_PA-B3	GCF_004365055.1	9,59054	Solo	NCBI
<i>P. phenazinium</i>	GAS86	GCF_900141745.1	8,31947	Solo de floresta	NCBI
<i>P. phenazinium</i>	GAS95	GCF_900142845.1	8,52694	Solo de floresta	NCBI
<i>P. phenazinium</i>	LMG 2247	GCF_900100735.1	8,59789	Solo enriquecido com treonina	(Viallard <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. phenoliruptrix</i>	BR3459a	GCF_000300095.1	7,65113	Nódulos radiculares ( <i>Mimosa flocculosa</i> )	(De Oliveira Cunha <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. phosphatilytica</i>	7QSK02	GCF_003443895.1	8,0983	Solo de floresta	NCBI
<i>P. phymatum</i>	STM815	GCF_000020045.1	8,67656	Nódulos radiculares ( <i>Machaerium lunatum</i> )	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. phytofirmans</i>	PsJN	GCF_000020125.1	8,21466	Raízes de cebola esterilizadas na superfície	(Sessitsch <i>et al.</i> , 2005)

<i>P. piptadeniae</i>	STM 7183	GCF_900007165.1	9,71005	Nódulos ( <i>Piptadenia gonoacantha</i> )	(Bournaud <i>et al.</i> , 2017)
<i>P. rhizosphaerae</i>	LMG 29544	GCF_004366595.1	7,50296	Solo da rizosfera	(Lee e Whang, 2015)
<i>P. rhynchosiae</i>	WSM 3937	GCF_002879865.1	8,0299	Nódulos radiculares ( <i>Rhynchosia ferulifolia</i> )	(De Meyer <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. ribeironis</i>	STM7296	GCF_900019265.1	7,27915	Nódulos radiculares ( <i>Piptadenia gonoacantha</i> )	(Bournaud <i>et al.</i> , 2017)
<i>P. sacchari</i>	LMG 19450	GCF_000785435.1	7,26374	Solo de uma plantação de cana de açúcar	(Brämer <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. sartisoli</i>	LMG 24000	GCF_900107685.1	5,93053	Solo contaminado com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. sedimicola</i>	ES_FE-E3	GCF_003610135.1	10,7183	Solo fora da rizosfera	NCBI
<i>P. sedimicola</i>	ES_PA-F4	GCF_003634155.1	11,1529	Solo fora da rizosfera	NCBI
<i>P. sedimicola</i>	ES_PA-E8	GCF_004362135.1	11,0283	Solo fora da rizosfera	NCBI
<i>P. sedimicola</i>	ES_PA-E9	GCF_004363325.1	10,9725	Solo fora da rizosfera	NCBI
<i>P. sedimicola</i>	LMG 24238	GCF_900104005.1	7,3116	Sedimentos de água doce	(Lim <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. silvatlantica</i>	PSCR-88	GCF_003096715.1	8,00608	Raízes de cana de açúcar	(Perin, Martinez-Aguilar, Paredes-Valdez, <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. silvatlantica</i>	TPCrh-89	GCF_003201275.1	8,00398	Rizosfera de cana de açúcar	(Perin, Martinez-Aguilar, Paredes-Valdez, <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. silvatlantica</i>	SRCL-318	GCF_003217075.1	8,08749	Folhas de cana de açúcar	(Perin, Martinez-Aguilar, Castro-Gonzalez, <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. silvatlantica</i>	SRCL-319	GCF_004363225.1	8,00925	Folhas de cana de açúcar	(Perin, Martinez-Aguilar, Castro-Gonzalez, <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. sp. 7MH5</i>	7MH5	GCF_004524855.1	10,3944	Solo florestal da Reserva da Biosfera de Dinghushan	(Xiao, Gao, Lin, <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. 7MK8-2</i>	7MK8-2	GCF_003628145.1	6,10496	Solo florestal da Reserva da Biosfera de Dinghushan	(Gao, Z.-H. <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. BL10I2N1</i>	BL10I2N1	GCF_004361815.1	9,20252	ND*	-

<i>P. sp. BL17N1</i>	BL17N1	GCF_003634175.1	8,65426	ND*	-
<i>P. sp. BL18I3N2</i>	BL18I3N2	GCF_003001875.1	8,7282	ND*	-
<i>P. sp. BL21I4N1</i>	BL21I4N1	GCF_002973525.1	8,44311	ND*	-
<i>P. sp. BL23I1N1</i>	BL23I1N1	GCF_003610295.1	9,11961	ND*	-
<i>P. sp. BL25I1N1</i>	BL25I1N1	GCF_003002025.1	8,73343	ND*	-
<i>P. sp. BL27I4N3</i>	BL27I4N3	GCF_003386115.1	8,95618	ND*	-
<i>P.sp. BL6665CI2N2</i>	BL6665CI2N2	GCF_004366535.1	9,57442	ND*	-
<i>P. sp. BL6669N2</i>	BL6669N2	GCF_003387275.1	9,94864	ND*	-
<i>P. sp. BL8N3</i>	BL8N3	GCF_004339005.1	9,61988	ND*	-
<i>P. sp. BL9I2N2</i>	BL9I2N2	GCF_004339745.1	9,96859	ND*	-
<i>P. sp. C35</i>	C35	GCF_003121405.1	9,70573	Turfa da floresta tropical do pântano	(Too <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. sp. CCGE1002</i>	CCGE1002	GCF_000092885.1	7,88486	Nódulos ( <i>Mimosa occidentalis</i> )	(Ormeno-Orrillo <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. sp. CNPSo 3008</i>	CNPSo 3008	GCF_004353905.1	9,5327	Nódulos ( <i>Mimosa gymnas</i> )	(Paulitsch <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. DCR13</i>	DCR13	GCF_003286395.1	4,40424	Rizosfera ( <i>Campanula</i> )	(Jung <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. DHOA04</i>	DHOA04	GCF_003837865.1	6,09655	Solo florestal da Reserva da Biosfera de Dinghushan	(Fu <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. DHOC27</i>	DHOC27	GCF_003429005.1	7,24596	Solo florestal da Reserva da Biosfera de Dinghushan	(Xiao, Gao, Yang, <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. DHOM06</i>	DHOM06	GCF_003367175.1	7,36995	Solo florestal da Reserva da Biosfera de Dinghushan	(Gao, Z.-H. <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. GV052</i>	GV052	GCF_003208595.1	7,28499	Raíz ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. GV060</i>	GV060	GCF_004341315.1	7,28282	Raíz ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. GV068</i>	GV068	GCF_003058125.1	7,28673	Raíz ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. GV072</i>	GV072	GCF_003050715.1	7,28455	Raíz ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. GV073</i>	GV073	GCF_004346905.1	7,28501	Raíz ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. JPY251</i>	JPY251	GCF_000372985.1	8,60952	Nódulos radiculares ( <i>Mimosa velloziana</i> )	NCBI

<i>P. sp. LD6</i>	LD6	GCF_004359985.1	6,9701	Solo de floresta	NCBI
<i>P. sp. NEAU-SY24</i>	NEAU-SY24	GCF_003390925.1	6,70091	Solo	(Fu <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. sp. OV446</i>	OV446	GCF_003201235.1	7,25734	Rizosfera e raizes ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. OV555</i>	OV555	GCF_003097055.1	6,32137	Rizosfera e raizes ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. PDC91</i>	PDC91	GCF_003253405.1	7,67511	Rizosfera e raizes ( <i>Populus</i> )	NCBI
<i>P. sp. RAU2J</i>	RAU2J	GCF_003634845.1	8,82892	Nódulos radiculares ( <i>Hypocalyptus coluteoides</i> )	(Beukes <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. sp. S27</i>	S27	GCF_003353175.1	8,40501	Solo perto de uma lagoa artificial	(Feng <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. SOS3</i>	SOS3	GCF_001922345.1	7,50291	Rizosfera de tomate	NCBI
<i>P. sp. UYCP14C</i>	UYCPa14C	GCF_004197395.1	9,83154	Nódulos ( <i>Calliandra parvifolia</i> )	(Langleib <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sprentiae</i>	WSM5005	GCF_001865575.1	7,82954	Nódulos radiculares ( <i>Lebeckia ambigua</i> )	(De Meyer <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. sprentiae</i>	WSM5005	GCF_000473465.1	7,76106	Nódulos radiculares ( <i>Lebeckia ambigua</i> )	(De Meyer <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. susongensis</i>	LMG 29540	GCF_900177725.1	7,719	Superfície de rocha resistida (Micaxistos)	(Gu <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. terrae</i>	DSM 17804	GCF_002902925.1	10,0625	Solo de floresta	(Nazir, Rashid <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. terrae</i>	NBRC 100964	GCF_000739835.1	9,92578	Solo de floresta	(Yang <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. terricola</i>	mHS1	GCF_003330825.1	7,11804	Solo de um campo agrícola de beterraba	(Carrion <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. terricola</i>	LMG 20594	GCF_900142195.1	7,3214	Horizonte B de um solo agrícola	(Goris <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. tropica</i>	P-31	GCF_001673675.1	8,90513	Rizosfera de romã ( <i>Punica granatum</i> )	(Kaur <i>et al.</i> , 2016)
<i>P. tropica</i>	Ppe8	GCF_002071575.1	8,7488	Caule de cana de açúcar	(Reis <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. tropica</i>	Slr-6563	GCF_003201665.1	8,8497	Sorgo	(Wong-Villarreal e Caballero-Mellado, 2010)
<i>P. tropica</i>	Slr-6529	GCF_003253955.1	8,8491	Sorgo	(Wong-Villarreal e Caballero-Mellado, 2010)
<i>P. tropica</i>	LMG 22274	GCF_900109265.1	8,58017	Caule de cana de açúcar	(Reis <i>et al.</i> , 2004)

<i>P. tropica</i>	KACC13422	GCF_007474615.1	8,641,252	ND*	-
<i>P. tuberum</i>	WSM4176	GCF_000372945.1	9,06525	Nódulos radiculares ( <i>Lebeckia ambigua</i> )	(De Meyer <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. tuberum</i>	DUS833	GCF_900101795.1	8,97731	<i>Aspalathus callosa</i>	(Elliott <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. unamae</i>	SCZa-39	GCF_003096875.1	10,1966	Haste de cana de açúcar	(Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. unamae</i>	CATux-332	GCF_003268775.1	9,83103	Cana de açúcar	(Castro-González <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. xenovorans</i>	LB400	GCF_000013645.1	9,73114	Solo contaminado com Bifenilos policlorados (PCB) de um aterro sanitário	(Goris <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. xenovorans</i>	LB400	GCF_000756045.1	9,70295	Solo contaminado com Bifenilos policlorados (PCB) de um aterro sanitário	(Goris <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. sp. BCC1884</i>	BCC1884	GCF_900996225.1	7,538,695	Rizomorfo ( <i>Phanerochaete sp. PW271</i> )	(Webster <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. BCC1885</i>	BCC1885	GCF_900996235.1	8,006,260	Rizomorfo ( <i>Phanerochaete sp. PW271</i> )	(Webster <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. sp. BCC1886</i>	BCC1886	GCF_900996245.1	7,681,282	Rizomorfo ( <i>Phanerochaete sp. PW271</i> )	(Webster <i>et al.</i> , 2019)

## 8. REFERÊNCIAS DO APÊNDICE

- ACHOUAK, W. et al. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 787-794, 1999. ISSN 1466-5034.
- AIZAWA, T. et al. *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminum-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. Pt 9, p. 2036-41, Sep 2010. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819996> >.
- AIZAWA, T. et al. *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. Pt 5, p. 1152-7, May 2010. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666801> >.
- AIZAWA, T. et al. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acid-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 7, p. 1645-50, Jul 2011. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709915> >.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997. ISSN 0305-1048.
- ANANDHAM, R. et al. Mixotrophic metabolism in *Burkholderia kururiensis* subsp. thiooxydans subsp. nov., a facultative chemolithoautotrophic thiosulfate oxidizing bacterium isolated from rhizosphere soil and proposal for classification of the type strain of *Burkholderia kururiensis* as *Burkholderia kururiensis* subsp. *kururiensis* subsp. nov. **Arch Microbiol**, v. 191, n. 12, p. 885-94, Dec 2009. ISSN 1432-072X (Electronic) 0302-8933 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841903> >.
- BAEK, I. et al. *Burkholderia monticola* sp. nov., isolated from mountain soil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 65, n. Pt 2, p. 504-9, Feb 2015. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25472981> >.
- BALDANI, J. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986. ISSN 1466-5034.
- BALDANI, J. et al. Emended description of *Herbaspirillum*; incursion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996. ISSN 1466-5034.
- BARTOLINI, S. et al. Effectiveness of *Azospirillum brasilense* Sp245 on young plants of *Vitis vinifera* L. **Open Life Sciences**, v. 12, n. 1, 2017. ISSN 2391-5412.

- BERTANI, I. et al. Rice bacterial endophytes: isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. **Environ Microbiol Rep**, v. 8, n. 3, p. 388-98, Jun 2016. ISSN 1758-2229 (Electronic) 1758-2229 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27038229> >.
- BEUKES, C. W. et al. South african papilionoid legumes are nodulated by diverse burkholderia with unique nodulation and nitrogen-fixation Loci. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68406, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874611> >.
- BOSCH, R.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F.; IMPERIAL, J. Identification of gene products from the *Azotobacter vinelandii* nifBfdxNnifOQ operon. **FEMS microbiology letters**, v. 157, n. 1, p. 19-25, 1997. ISSN 1574-6968.
- BOSCH, R. et al. The Nifo Gene Product is Responsible for the Ability of *Azotobacter Vinelandii* to Simultaneously Assimilate Nitrate and N<sub>2</sub>. In: (Ed.). **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**: Springer, 1995. p.213-261.
- BOURNAUD, C. et al. *Paraburkholderia piptadeniae* sp. nov. and *Paraburkholderia ribeironis* sp. nov., two root-nodulating symbiotic species of *Piptadenia gonoacantha* in Brazil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 67, n. 2, p. 432-440, Feb 2017. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27902255> >.
- BRÄMER, C. O. et al. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1709-1713, 2001. ISSN 1466-5034.
- BROWN, S. D. et al. Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. **J Bacteriol**, v. 194, n. 21, p. 5991-3, Nov 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045501> >.
- CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 4, p. 1165-72, Jul 2004. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280286> >.
- CABALLERO-MELLADO, J. et al. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 16, p. 5308-19, Aug 2007. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17601817> >.
- CAIRNS, J. et al. Construction and Characterization of Synthetic Bacterial Community for Experimental Ecology and Evolution. **Front Genet**, v. 9, p. 312, 2018. ISSN 1664-8021 (Print) 1664-8021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30154827> >.

- CAPELLA-GUTIERREZ, S.; SILLA-MARTINEZ, J. M.; GABALDON, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1972-3, Aug 1 2009. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505945> >.
- CARRION, V. J. et al. Involvement of Burkholderiaceae and sulfurous volatiles in disease-suppressive soils. **ISME J**, v. 12, n. 9, p. 2307-2321, Sep 2018. ISSN 1751-7370 (Electronic) 1751-7362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29899517> >.
- CASTRO-GONZÁLEZ, R. et al. High diversity of culturable Burkholderia species associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 345, n. 1-2, p. 155-169, 2011. ISSN 0032-079X 1573-5036.
- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and soil**, v. 108, n. 1, p. 23-31, 1988. ISSN 0032-079X.
- CHAUDHARI, N. M.; GUPTA, V. K.; DUTTA, C. BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. **Sci Rep**, v. 6, p. 24373, Apr 13 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27071527> >.
- CHEN, W. M. et al. Burkholderia mimosarum sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp. from Taiwan and South America. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. Pt 8, p. 1847-51, Aug 2006. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16902019> >.
- CHEN, W. M. et al. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. **J Bacteriol**, v. 185, n. 24, p. 7266-72, Dec 2003. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645288> >.
- CHENG, W. et al. Draft Genome Sequence of Endophytic Herbaspirillum sp. Strain WT00C, a Tea Plant Growth-Promoting Bacterium. **Genome Announc**, v. 5, n. 11, Mar 16 2017. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28302787> >.
- COUTINHO, B. G. et al. Draft Genome Sequence of the Rice Endophyte Burkholderia kururiensis M130. **Genome Announc**, v. 1, n. 2, p. e0022512, Apr 4 2013. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558537> >.
- DALL'AGNOL, R. F. et al. Genome Sequence of Paraburkholderia nodosa Strain CNPSo 1341, a N<sub>2</sub>-Fixing Symbiont of the Promiscuous Legume Phaseolus vulgaris. **Genome Announc**, v. 4, n. 6, Nov 3 2016. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27811087> >.
- DE MEYER, S. E. et al. Burkholderia rhynchosiae sp. nov., isolated from Rhynchosia ferulifolia root nodules. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, n. Pt 11, p. 3944-9, Nov 2013. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23710046> >.

- DE MEYER, S. E. et al. *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, n. Pt 4, p. 1090-5, Apr 2014. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24368690> >.
- DE MEYER, S. E. et al. Symbiotic and non-symbiotic *Paraburkholderia* isolated from South African *Lebeckia ambigua* root nodules and the description of *Paraburkholderia fynbosensis* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 68, n. 8, p. 2607-2614, Aug 2018. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29957169> >.
- DE OLIVEIRA CUNHA, C. et al. Complete genome sequence of *Burkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a heat-tolerant, nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa flocculosa*. **J Bacteriol**, v. 194, n. 23, p. 6675-6, Dec 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23144415> >.
- DE SOUZA, V. et al. Draft genome sequence of *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* IAM 15032, a strain isolated from well water. **Genome announcements**, v. 1, n. 1, 2013.
- DENG, D. et al. Synchronic Biotransformation of 1,4-Dioxane and 1,1-Dichloroethylene by a Gram-Negative Propanotroph *Azoarcus* sp. DD4. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 5, n. 8, p. 526-532, 2018. ISSN 2328-8930/2328-8930.
- DEVANADERA, A. et al. Complete Genome Sequence of an Anaerobic Benzene-Degrading Bacterium, *Azoarcus* sp. Strain DN11. **Microbiol Resour Announc**, v. 8, n. 11, Mar 14 2019. ISSN 2576-098X (Electronic) 2576-098X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30938329> >.
- DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiens*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 6, p. 2223-30, Nov 2004. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545462> >.
- DOBRIŤSA, A. P.; REDDY, M. C.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. Pt 6, p. 1418-26, Jun 2010. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671717> >.
- DOBRIŤSA, A. P.; SAMADPOUR, M. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, n. 8, p. 2836-2846,

- Aug 2016. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27054671> >.
- DU, X. J. et al. Genome sequence of *Gluconacetobacter* sp. strain SXCC-1, isolated from Chinese vinegar fermentation starter. **J Bacteriol**, v. 193, n. 13, p. 3395-6, Jul 2011. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551293> >.
- ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 17-26, 2001. ISSN 1466-5034.
- EDGAR, R. **Usearch**. Lawrence Berkeley National Lab.(LBNL), Berkeley, CA (United States). 2010
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004. ISSN 1362-4962.
- EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-1, Oct 1 2010. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709691> >.
- ELBELTAGY, A. et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 11, p. 5285-93, Nov 2001. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679357> >.
- ELBELTAGY, A. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 617-629, 2000. ISSN 0038-0768/1747-0765.
- ELLIOTT, G. et al. *Burkholderia tuberum* Effectively Nodulates *Cyclopia* spp., but Not *Aspalathus* spp. In: (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture**: Springer, 2008. p.287-288.
- ESMAEEL, Q. et al. Genome sequencing and traits analysis of *Burkholderia* strains reveal a promising biocontrol effect against grey mould disease in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **World J Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 3, p. 40, Feb 9 2019. ISSN 1573-0972 (Electronic) 0959-3993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30739227> >.
- FAN, M. C. et al. *Herbaspirillum robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a lead-zinc mine. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 68, n. 4, p. 1300-1306, Apr 2018. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29485397> >.
- FAORO, H. et al. Genome comparison between clinical and environmental strains of *Herbaspirillum seropedicae* reveals a potential new emerging bacterium adapted to human hosts. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 630, Aug 2 2019. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31375067> >.

- FAORO, H. et al. The oil-contaminated soil diazotroph *Azoarcus olearius* DQS-4(T) is genetically and phenotypically similar to the model grass endophyte *Azoarcus* sp. BH72. **Environ Microbiol Rep**, v. 9, n. 3, p. 223-238, Jun 2017. ISSN 1758-2229 (Electronic) 1758-2229 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27893193> >.
- FARH, A. E.-A. et al. *Burkholderia ginsengiterrae* sp. nov. and *Burkholderia panaciterrae* sp. nov., antagonistic bacteria against root rot pathogen *Cylindrocarpon destructans*, isolated from ginseng soil. **Arch Microbiol**, v. 197, n. 3, p. 439-47, Apr 2015. ISSN 1432-072X (Electronic) 0302-8933 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25537097> >.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981. ISSN 0022-2844.
- FENG, T. et al. *Paraburkholderia lacunae* sp. nov., isolated from soil near an artificial pond. **J Microbiol**, v. 57, n. 4, p. 232-237, Apr 2019. ISSN 1976-3794 (Electronic) 1225-8873 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30656589> >.
- FOMENKOV, A. et al. Complete Genome Sequence of a Strain of *Azospirillum thiophilum* Isolated from a Sulfide Spring. **Genome Announc**, v. 4, n. 1, Jan 7 2016. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26744373> >.
- FONTANA, C. A. et al. Genome Sequence of *Azospirillum brasilense* REC3, Isolated from Strawberry Plants. **Genome Announc**, v. 6, n. 8, Feb 22 2018. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29472339> >.
- FU, J.-C. et al. *Paraburkholderia dinghuensis* sp. nov., isolated from soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2019.
- FU, Y. et al. *Trinickia diaoshuihuensis* sp. nov., a plant growth promoting bacterium isolated from soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 69, n. 1, p. 291-296, 2018. ISSN 1466-5034.
- GAO, N. et al. Genome Sequences of Two *Azospirillum* sp. Strains, TSA2S and TSH100, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria with N<sub>2</sub>O Mitigation Abilities. **Microbiol Resour Announc**, v. 8, n. 32, Aug 8 2019. ISSN 2576-098X (Electronic) 2576-098X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31395630> >.
- GAO, Z.-H. et al. *Trinickia dinghuensis* sp. nov. and *Trinickia fusca* sp. nov., isolated from forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 69, n. 5, p. 1390-1397, 2019. ISSN 1466-5034.
- GAO, Z. et al. *Paraburkholderia caffeinilytica* sp. nov., isolated from the soil of a tea plantation. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4185-4190, Oct 2016. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27469334> >.
- GIONGO, A. et al. Two genome sequences of the same bacterial strain, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, suggest a new standard in genome sequence submission. **Stand**

- Genomic Sci**, v. 2, n. 3, p. 309-17, Jun 15 2010. ISSN 1944-3277 (Electronic) 1944-3277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304715> >.
- GORIS, J. et al. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 5, p. 1677-81, Sep 2004. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388727> >.
- GORIS, J. et al. Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pEMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. **Syst Appl Microbiol**, v. 25, n. 3, p. 340-52, Oct 2002. ISSN 0723-2020 (Print) 0723-2020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421072> >.
- GROUZDEV, D. S. et al. Genome Sequence of Methylophilic *Azospirillum* sp. Strain B2, Isolated from a Raised Sphagnum Bog. **Genome Announc.**, v. 6, n. 23, p. e00492-18, 2018. ISSN 2169-8287.
- GU, J. Y. et al. *Burkholderia susongensis* sp. nov., a mineral-weathering bacterium isolated from weathered rock surface. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 65, n. Pt 3, p. 1031-7, Mar 2015. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25575828> >.
- GUIZELINI, D. et al. Complete Genome Sequence of *Herbaspirillum hiltneri* N3 (DSM 17495), Isolated from Surface-Sterilized Wheat Roots. **Genome Announc**, v. 3, n. 5, Oct 29 2015. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514770> >.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010. ISSN 0032-079X/1573-5036.
- HUREK, T. et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 7, p. 1913-1923, 1994. ISSN 0021-9193.
- IM, W. T. et al. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 3, p. 851-5, May 2004. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143035> >.
- JANG, J. et al. Potentially Mobile Denitrification Genes Identified in *Azospirillum* sp. Strain TSH58. **Appl Environ Microbiol**, v. 85, n. 2, Jan 15 2019. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30413471> >.
- JAUREGUI, R. et al. Draft Genome Sequence of the Naphthalene Degradator *Herbaspirillum* sp. Strain RV1423. **Genome Announc**, v. 2, n. 2, Mar 20 2014. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24652979> >.

- JUNG, M. Y. et al. Paraburkholderia dokdonella sp. nov., isolated from a plant from the genus Campanula. **J Microbiol**, v. 57, n. 2, p. 107-112, Feb 2019. ISSN 1976-3794 (Electronic) 1225-8873 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30456756> >.
- JUNG, S. Y. et al. Herbaspirillum rhizosphaerae sp. nov., isolated from rhizosphere soil of Allium victorialis var. platyphyllum. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. Pt 10, p. 2284-8, Oct 2007. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911298> >.
- JUNGHARE, M.; PATIL, Y.; SCHINK, B. Draft genome sequence of a nitrate-reducing, o-phthalate degrading bacterium, Azoarcus sp. strain PA01(T). **Stand Genomic Sci**, v. 10, p. 90, 2015. ISSN 1944-3277 (Print) 1944-3277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26516406> >.
- KANEKO, T. et al. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte Azospirillum sp. B510. **DNA Res**, v. 17, n. 1, p. 37-50, Feb 2010. ISSN 1756-1663 (Electronic) 1340-2838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047946> >.
- KANG, S. R.; SRINIVASAN, S.; LEE, S. S. Burkholderia eburnea sp. nov., isolated from peat soil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, n. Pt 4, p. 1108-15, Apr 2014. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363296> >.
- KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; GANESHAMURTHY, A. N. Draft Genome Sequence of Phosphate-Solubilizing Bacterium Paraburkholderia tropica Strain P-31 Isolated from Pomegranate (Punica granatum) Rhizosphere. **Genome Announc**, v. 4, n. 4, Aug 18 2016. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27540068> >.
- KIM, H.-S. et al. Complete genome sequences of Azoarcus sp. TSPY31 and TSNA42 potentially having biosynthetic ability to produce indigo. **The Microbiological Society of Korea**, v. 54, n. 3, p. 283-285, 2018.
- KIM, H. B. et al. Burkholderia ginsengisoli sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. Pt 11, p. 2529-33, Nov 2006. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082385> >.
- KIM, Y.-E. et al. Complete genome sequence of Herbaspirillum sp. meg3 isolated from soil. **The Korean Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 326-328, 2017. ISSN 0440-2413.
- KWAK, Y.; SHIN, J.-H. First Azospirillum genome from aquatic environments: Whole-genome sequence of Azospirillum thiophilum BV-ST, a novel diazotroph harboring a capacity of sulfur-chemolithotrophy from a sulfide spring. **Marine genomics**, v. 25, p. 21-24, 2016. ISSN 1874-7787.
- LANGLEIB, M. et al. Draft Genome Sequence of Paraburkholderia sp. UYCP14C, a Rhizobium Strain Isolated from Root Nodules of Calliandra parvifolia. **Microbiol Resour Announc**, v. 8, n. 16, p. e00173-19, 2019. ISSN 2576-098X.

- LEE, G. W.; LEE, K.-J.; CHAE, J.-C. **Genome sequence of *Herbaspirillum* sp. strain GW103, a plant growth-promoting bacterium**: *Am Soc Microbiol* 2012.
- LEE, J. C.; WHANG, K. S. *Burkholderia humisilvae* sp. nov., *Burkholderia solisilvae* sp. nov. and *Burkholderia rhizosphaerae* sp. nov., isolated from forest soil and rhizosphere soil. ***Int J Syst Evol Microbiol***, v. 65, n. 9, p. 2986-92, Sep 2015. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26031294> >.
- LEE, Y.; JEON, C. O. *Paraburkholderia aromaticivorans* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, isolated from gasoline-contaminated soil. ***Int J Syst Evol Microbiol***, v. 68, n. 4, p. 1251-1257, Apr 2018. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29461181> >.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. ***Bioinformatics***, v. 23, n. 1, p. 127-8, Jan 1 2007. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050570> >.
- LI, Z. et al. A colorimetric assay of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. ***Lett Appl Microbiol***, v. 53, n. 2, p. 178-85, Aug 2011. ISSN 1472-765X (Electronic) 0266-8254 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21599721> >.
- LIM, J. H.; BAEK, S. H.; LEE, S. T. *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. ***Int J Syst Evol Microbiol***, v. 58, n. Pt 3, p. 565-9, Mar 2008. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319455> >.
- LIN, S.-Y. et al. 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***, v. 105, n. 6, p. 1149-1162, 2014. ISSN 0003-6072/1572-9699.
- LOONG, S. K. et al. Draft genome of *Paraburkholderia fungorum* sequence type 868 recovered from human synovial tissues. ***Data Brief***, v. 25, p. 104159, Aug 2019. ISSN 2352-3409 (Electronic) 2352-3409 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31312701> >.
- MACHADO, H. et al. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. ***Canadian journal of microbiology***, v. 37, n. 7, p. 549-553, 1991. ISSN 0008-4166.
- MARTIN-MOLDES, Z. et al. Whole-genome analysis of *Azoarcus* sp. strain CIB provides genetic insights to its different lifestyles and predicts novel metabolic features. ***Syst Appl Microbiol***, v. 38, n. 7, p. 462-71, Oct 2015. ISSN 1618-0984 (Electronic) 0723-2020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259823> >.
- MARTINEZ-AGUILAR, L. et al. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. ***Antonie Van Leeuwenhoek***, v. 104, n. 6, p. 1063-71, Dec 2013. ISSN 1572-9699

- (Electronic) 0003-6072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24057982> >.
- MAVENGERE, N. R.; ELLIS, A. G.; LE ROUX, J. J. Burkholderia aspalathi sp. nov., isolated from root nodules of the South African legume Aspalathus abietina Thunb. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, n. Pt 6, p. 1906-12, Jun 2014. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599894> >.
- MISHRA, R. P. et al. Genetic diversity of Mimosa pudica rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of Burkholderia phymatum and other beta-rhizobia. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 79, n. 2, p. 487-503, Feb 2012. ISSN 1574-6941 (Electronic) 0168-6496 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093060> >.
- MONTEIRO, R. A. et al. Genomic comparison of the endophyte Herbaspirillum seropedicae SmR1 and the phytopathogen Herbaspirillum rubrisubalbicans M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 80, n. 2, p. 441-51, May 2012. ISSN 1574-6941 (Electronic) 0168-6496 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22268687> >.
- NAVARRO-RODRIGUEZ, M.; BUESA, J. M.; RUBIO, L. M. Genetic and Biochemical Analysis of the Azotobacter vinelandii Molybdenum Storage Protein. **Front Microbiol**, v. 10, p. 579, 2019. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30984129> >.
- NAZIR, R. et al. Draft genome sequence of the soil bacterium Burkholderia terrae strain BS001, which interacts with fungal surface structures. **J Bacteriol**, v. 194, n. 16, p. 4480-1, Aug 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843604> >.
- NAZIR, R. et al. The capacity to comigrate with Lyophyllum sp. strain Karsten through different soils is spread among several phylogenetic groups within the genus Burkholderia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 50, p. 221-233, 2012. ISSN 00380717.
- NGUYEN, L. T. et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Mol Biol Evol**, v. 32, n. 1, p. 268-74, Jan 2015. ISSN 1537-1719 (Electronic) 0737-4038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25371430> >.
- NISHIZAWA, T. et al. Complete genome sequence of the denitrifying and N<sub>2</sub>O-reducing bacterium Azoarcus sp. strain KH32C. **J Bacteriol**, v. 194, n. 5, p. 1255, Mar 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22328754> >.
- NIU, B.; KOLTER, R. Complete Genome Sequences of Seven Strains Composing a Model Bacterial Community of Maize Roots. **Genome Announc**, v. 5, n. 36, Sep 7 2017. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28883152> >.

- OHTSUBO, Y. et al. Complete genome sequence of *Burkholderia caribensis* Bcrs1W (NBRC110739), a strain co-residing with phenanthrene degrader *Mycobacterium* sp. EPa45. **J Biotechnol**, v. 228, p. 67-68, Jun 20 2016. ISSN 1873-4863 (Electronic) 0168-1656 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27130496> >.
- OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 7-8, Jan 2016. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26865552> >.
- ORMENO-ORRILLO, E. et al. Genome sequences of *Burkholderia* sp. strains CCGE1002 and H160, isolated from legume nodules in Mexico and Brazil. **J Bacteriol**, v. 194, n. 24, p. 6927, Dec 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209196> >.
- OTSUKA, Y. et al. *Burkholderia oxyphila* sp. nov., a bacterium isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, n. Pt 2, p. 249-54, Feb 2011. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207808> >.
- PAN, Y.; KONG, K. F.; TSANG, J. S. Complete genome sequence and characterization of the haloacid-degrading *Burkholderia caribensis* MBA4. **Stand Genomic Sci**, v. 10, p. 114, 2015. ISSN 1944-3277 (Print) 1944-3277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629309> >.
- PAULITSCH, F. et al. *Paraburkholderia guartelaensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from nodules of *Mimosa gymnas* in an ecotone considered as a hotspot of biodiversity in Brazil. **Arch Microbiol**, v. 201, n. 10, p. 1435-1446, Dec 2019. ISSN 1432-072X (Electronic) 0302-8933 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31428824> >.
- PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genet**, v. 7, n. 5, p. e1002064, May 2011. ISSN 1553-7404 (Electronic) 1553-7390 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21589895> >.
- PERIN, L. et al. Diazotrophic burkholderia species associated with field-grown maize and sugarcane. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 5, p. 3103-10, May 2006. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672447> >.
- PERIN, L. et al. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. Pt 8, p. 1931-7, Aug 2006. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16902033> >.
- PRASAD, D. V.; MADHUSUDANAN, S.; JAGANATHAN, S. uCLUST-A NEW ALGORITHM FOR CLUSTERING UNSTRUCTURED DATA. 2006.
- PRATAMA, A. A.; VAN ELSAS, J. **The Ecology and Evolution of Bacteriophages of Mycosphere-inhabiting Paraburkholderia Ssp.** Rijksuniversiteit Groningen, 2018. ISBN 9403410434.

- PRIGENT-COMBARET, C. et al. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 65, n. 2, p. 202-19, Aug 2008. ISSN 0168-6496 (Print) 0168-6496 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400007> >.
- PRITCHARD, L. et al. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 12-24, 2016. ISSN 1759-9660 1759-9679.
- REINHOLD-HUREK, B. et al. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 574-584, 1993. ISSN 1466-5034.
- REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 6, p. 2155-62, Nov 2004. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545451> >.
- RICHTER, M.; ROSSELLO-MORA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 45, p. 19126-31, Nov 10 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855009> >.
- RIVERA, D. et al. Complete Genome Sequence of the Model Rhizosphere Strain *Azospirillum brasilense* Az39, Successfully Applied in Agriculture. **Genome Announc**, v. 2, n. 4, Jul 24 2014. ISSN 2169-8287 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059863> >.
- ROBINSON, S. L. et al. Microbial biodegradation of biuret: defining biuret hydrolases within the isochorismatase superfamily. **Environ Microbiol**, v. 20, n. 6, p. 2099-2111, Jun 2018. ISSN 1462-2920 (Electronic) 1462-2912 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29528550> >.
- RODRIGUEZ-QUINONES, F.; BOSCH, R.; IMPERIAL, J. Expression of the *nifBfdxNnifOQ* region of *Azotobacter vinelandii* and its role in nitrogenase activity. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 10, p. 2926-2935, 1993. ISSN 0021-9193.
- ROJAS-ROJAS, F. U. et al. Draft genome of *Paraburkholderia caballeronis* TNe-841(T), a free-living, nitrogen-fixing, tomato plant-associated bacterium. **Stand Genomic Sci**, v. 12, p. 80, 2017. ISSN 1944-3277 (Print) 1944-3277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29255574> >.
- RUSCH, A. et al. *Burkholderia insulsa* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic bacterium isolated from an arsenic-rich shallow marine hydrothermal system. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 65, n. Pt 1, p. 189-94, Jan 2015. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323596> >.

- SCHENK, S. U.; WERNER, D. Fatty acid analysis of four *Azospirillum* species reveals three groups. **Archives of microbiology**, v. 149, n. 6, p. 580-582, 1988. ISSN 0302-8933.
- SCHÜLLER, G.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2013-2020, 2000. ISSN 1466-5026.
- SCHWAB, S.; TERRA, L. A.; BALDANI, J. I. Genomic characterization of *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC, a nitrogen-fixing bacterium isolated from surface-sterilized sugarcane stems. **Mol Genet Genomics**, v. 293, n. 4, p. 997-1016, Aug 2018. ISSN 1617-4623 (Electronic) 1617-4623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29696375> >.
- SESSITSCH, A. et al. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, n. Pt 3, p. 1187-92, May 2005. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879253> >.
- SHEU, S. Y. et al. *Burkholderia dipogonis* sp. nov., isolated from root nodules of *Dipogon lignosus* in New Zealand and Western Australia. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 65, n. 12, p. 4716-23, Dec 2015. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26410793> >.
- SHEU, S. Y. et al. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, n. Pt 2, p. 435-41, Feb 2013. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22467155> >.
- SIGIDA, E. N. et al. Structure of repeating units of a polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR80. **Carbohydr Res**, v. 371, p. 40-4, Apr 19 2013. ISSN 1873-426X (Electronic) 0008-6215 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500958> >.
- SINGH, C. et al. Whole-Genome Sequences of Four Indian Isolates of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology resource announcements**, v. 8, n. 31, p. e00633-19, 2019. ISSN 2576-098X.
- SONG, B. et al. Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1129-1140, 1999. ISSN 1466-5034.
- STEENKAMP, E. T. et al. *Burkholderia kirstenboschensis* sp. nov. nodulates papilionoid legumes indigenous to South Africa. **Syst Appl Microbiol**, v. 38, n. 8, p. 545-54, Dec 2015. ISSN 1618-0984 (Electronic) 0723-2020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26472229> >.
- STRAUB, D. et al. The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30(T) identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. **Front Microbiol**, v. 4, p. 168,

2013. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825472> >.
- TABOADA, B. et al. Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. **Bioinformatics**, v. 34, n. 23, p. 4118-4120, Dec 1 2018. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29931111> >.
- TARRAND, 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. **Canadian journal of microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978. ISSN 0008-4166.
- TETZ, V.; TETZ, G. Draft Genome Sequence of the Uropathogenic *Herbaspirillum frisingense* Strain ureolyticus VT-16-41. **Genome Announc.**, v. 5, n. 17, p. e00279-17, 2017. ISSN 2169-8287.
- TOO, C. C. et al. Draft Genome Sequence of *Paraburkholderia* sp. Strain C35, Isolated from a Malaysian Tropical Peat Swamp Forest. **Genome Announc.**, v. 6, n. 25, Jun 21 2018. ISSN 2169-8287 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29930066> >.
- UNIPROT, C. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. D1, p. D158-D169, Jan 4 2017. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899622> >.
- VALVERDE, A. et al. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. Pt 10, p. 2421-5, Oct 2006. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012573> >.
- VANDAMME, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002. ISSN 0723-2020.
- VANDAMME, P. et al. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. Pt 10, p. 2228-35, Oct 2007. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911288> >.
- VANLAERE, E. et al. *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. Pt 2, p. 420-3, Feb 2008. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218942> >.
- VIALLARD, V. et al. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] phenazinium, [*Pseudomonas*] pyrrocinia and [*Pseudomonas*] glathei as *Burkholderia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 549-563, 1998. ISSN 1466-5034.

- WEBSTER, G. et al. The Genome Sequences of Three Paraburkholderia sp. Strains Isolated from Wood-Decay Fungi Reveal Them as Novel Species with Antimicrobial Biosynthetic Potential. **Microbiology resource announcements**, v. 8, n. 34, p. e00778-19, 2019. ISSN 2576-098X.
- WEISS, V. A. et al. **Draft genome sequence of Herbaspirillum lusitanum P6-12, an endophyte isolated from root nodules of Phaseolus vulgaris**: Am Soc Microbiol 2012.
- WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating Burkholderia species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Syst Appl Microbiol**, v. 33, n. 1, p. 35-43, Jan 2010. ISSN 1618-0984 (Electronic) 0723-2020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945811> >.
- XIAO, S.-Y. et al. Paraburkholderia pallida sp. nov. and Paraburkholderia silviterrae sp. nov., isolated from forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, p. ijsem003681, 2019. ISSN 1466-5026.
- XIAO, S.-Y. et al. Paraburkholderia telluris sp. nov., isolated from subtropical forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 69, n. 5, p. 1274-1280, 2019. ISSN 1466-5034.
- YANG, H. C. et al. Burkholderia terrae sp. nov., isolated from a forest soil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. Pt 2, p. 453-7, Feb 2006. ISSN 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449457> >.
- YE, W. et al. Genome sequence of the pathogenic Herbaspirillum seropedicae strain Os34, isolated from rice roots. **J Bacteriol**, v. 194, n. 24, p. 6993-4, Dec 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209241> >.
- ZHANG, H. et al. Burkholderia kururiensis sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 743-749, 2000. ISSN 1466-5034.
- ZHANG, R. et al. Azospirillum griseum sp. nov., isolated from lakewater. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2019.
- ZHOU, J. et al. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth of toluene and description of Azoarcus tolulyticus sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 45, n. 3, p. 500-6, Jul 1995. ISSN 0020-7713 (Print) 0020-7713 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8590677> >.
- ZHOU, S. et al. Azospirillum humicireducens sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, n. Pt 7, p. 2618-24, Jul 2013. ISSN 1466-5034 (Electronic) 1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264502> >.

- ZHU, B. et al. Genome sequence of the pathogenic *Herbaspirillum seropedicae* strain Os45, isolated from rice roots. **J Bacteriol**, v. 194, n. 24, p. 6995-6, Dec 2012. ISSN 1098-5530 (Electronic) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209242> >.
- ZORRAQUINO, V. et al. Draft Genome Sequence of the Nitrogen-Fixing Endophyte *Azoarcus communis* SWub3. **Microbiology resource announcements**, v. 7, n. 13, 2018.
- ЕЛЬКИН, А. et al. С 37 Высокие технологии, определяющие качество жизни.