

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)**

**ÉRICA NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE  
LEGUMINOSAS NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

**PONTA GROSSA  
2022**

**ÉERICA NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR RIZOBIOS ISOLADOS DE  
LEGUMINOSAS NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração de Caracterização da Biodiversidade).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Jesiane S. da Silva Batista

**PONTA GROSSA  
2022**

N244

Nascimento, Érica

Avaliação da solubilização de fosfato por rizóbios isolados de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná. / Érica Nascimento. Ponta Grossa, 2022. 70 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jesiane Stefania Batista.

1. Parabrachyella. 2. Bpcc. 3. Genômica. 4. Solubilização. 5. Fosfato inorgânico. I. Batista, Jesiane Stefania. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.T.

CDD: 574.87



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva**  
*Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)*



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 01/2022/UEPG**

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo(a) candidato(a) Erica Nascimento.

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e dois, sob a presidência do(a) Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista em sessão pública por sessão remota, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **Erica Nascimento**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dra. Fabiane Paulistch (Agrocete Indústria de Fertilizantes), Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski (UEPG) e Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira (UEPG) – Suplente. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o(a) candidato(a) passou a defesa de sua dissertação intitulada: “Avaliação da solubilização de fosfato por Rizóbios isolados de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná”. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o candidato **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 90 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não. ☒

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de dois mil e vinte e dois.

Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista

Dra. Fabiane Paulistch (Agrocete Indústria de Fertilizantes)

Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski (UEPG)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus amados pais, Leivas e Marileia, pois sem seus esforços e sacrifícios diários eu jamais teria pisado nesta Universidade um dia. Obrigada por tanto! Eu nunca conseguirei retribuir tudo isso devidamente, mas que fique o registro de tamanho amor e dedicação. Amo vocês!

A minha preciosa orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jesiane Batista, uma mulher incrível que me ensinou muito mais do que ciência, me ensinou a ser uma pessoa melhor, a olhar para as necessidades de todos ao meu redor, a sempre estar disposto a ajudar quem quer que precise se estiver a nosso alcance. Você me ajudou de todas as formas possíveis pra que eu pudesse concluir este trabalho, fez muito além do que uma orientadora tem que fazer e sou muito grata por ter tido a benção de ter você no meu caminho. Mãe Jesi, obrigada! Eu saio desse mestrado sendo uma mulher melhor graças a você e teu exemplo diário de ser humano.

Ao meu amor, Felipe, por ter paciência com tantos dias ruins, por me ajudar nos experimentos de final de semana, a entender toda a química da minha pesquisa e principalmente por ser luz nos meus dias. Ter o teu abraço no fim de um dia difícil me manteve feliz e grata até nos piores momentos. Te amo!

As minhas companheiras de laboratório, Andrelise e Rosana que me ajudaram em tantos experimentos e compartilharam todas as frustrações dos que não saíram como o planejado. Foi bem mais leve e divertido o fardo quando vocês estiveram lá comigo. A minha querida Jé, amizade que levarei pra sempre com carinho, me ajudou no início dessa caminhada e mesmo estando longe fisicamente. A Fabi, que me trouxe paz em momentos difíceis, obrigada por compartilhar sua luz!

E não poderiam faltar meus queridos amigos que vieram da graduação para o mestrado, onde compartilhamos todo o desespero diário com as nossas pesquisas, pudemos aprender juntos e nos mantermos no caminho, Raylen, Jhon e em especial a Ju minha companheira da micro, com quem eu pude desabafar nos mínimos detalhes sobre cada experimento. Ao Gabe e a Tay, que mais estiveram ao meu lado nos momentos terríveis e que tudo pareceu sem sentido, da Bio pra vida, obrigada por esses 6 anos de amizade!

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao PPG Biologia Evolutiva pela grande oportunidade de realizar essa pesquisa, aos professores que tive nesses anos, por cada um, que de alguma maneira contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

A Embrapa Soja, a UEL, ao Laboratório de Genética e Evolução, ao LABMOM, ao Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia, ao Laboratório de Microbiologia, ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Rafael Bertoni, a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisete Rodrigues, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Ricardo Olchanheski e a Caroline Rosa Silva, por todos os equipamentos e reagentes cedidos, pelos experimentos e análises realizadas para que esta pesquisa fosse concluída.

Por fim, a todos que estiveram em meu caminho e que de alguma maneira, contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O fósforo (P) é um nutriente limitante para espécies vegetais e consequentemente, para o equilíbrio de ecossistemas. No solo, o P encontra-se como íons fosfato associados a metais, que não são passíveis de incorporação pelas espécies vegetais. Fontes de fosfato podem ser biodisponibilizadas por meio da solubilização de fosfato, processo realizado por grupos especializados de fungos e bactérias. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de solubilização de fosfatos por rizóbios isolados de nódulos radiculares de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná-Brasil previamente caracterizados genética e fisiologicamente. Das quarenta estirpes dos gêneros *Paraburkholderia*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* avaliadas, quinze apresentaram solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em meio NBRIP sólido. As cinco estirpes que apresentaram maiores índices de solubilização (IS), pertencem ao gênero *Paraburkholderia*, e foram caracterizadas quantitativa e geneticamente quanto à tal capacidade. Essas estirpes tiveram a solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  quantificada em NBRIP líquido apresentando de 110,67 a 367,6 mg/L de fosfato solúvel após sete dias de incubação, acompanhada de acidificação do pH do meio. Observou-se correlação negativa entre acidificação do meio e quantidade de P solubilizado em meio líquido, diferentemente do IS em meio sólido. Realizou-se a quantificação da capacidade solubilizadora em meio líquido para outras duas fontes de fosfato,  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$ , cujos testes em meio sólido não resultaram em halos de solubilização. As cinco estirpes apresentaram solubilização das duas fontes de P em meio líquido (1,42 a 4,49 mg/L em NBRIP +  $\text{FePO}_4$  e de 3,15 a 6,17 mg/L NBRIP +  $\text{AlPO}_4$ ) e acidificação do meio, resultado que evidencia a importância de ampliação testes para seleção de estirpes. Avaliou-se também os IS das cinco estirpes de *Paraburkholderia* em NBRIP+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  com diferentes fontes de carbono, onde os maiores índices foram obtidos com glicose em relação ao manitol e sacarose. Visando uma maior compreensão dos determinantes genéticos da solubilização de fosfato no gênero *Paraburkholderia*, foi realizado o sequenciamento e anotação do genoma da estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSo 3281 bem como análise *in silico* de genes relacionados à solubilização de fosfato de espécies solubilizadoras do gênero, incluindo *P. nodosa* e *P. guartelaensis*. Verificou-se uma relação entre presença/ausência de genes e filogenia das *Paraburkholderia* avaliadas. Foram identificados genes para fosfatases ácidas, codificadores de enzimas atuantes na produção de ácidos orgânicos, (como *gcd-pqq*), para glicose desidrogenase dependente de pirroloquinolina, (que está envolvida na síntese de ácido gluconico, relatado como o principal ácido orgânico envolvido na solubilização de fosfato), dentre outros. A presença destes genes pode ter associação com a produção de ácidos orgânicos, reduções nos valores de pH dos cultivos destas estirpes e habilidade solubilizadora. A solubilização de fosfato por bactérias do gênero *Paraburkholderia* pode estar relacionada a maior tolerância a pH ácido, considerando a implicação da produção de ácidos orgânicos nesse processo. Ressalta-se a importância da versatilidade metabólica de estirpes nativas de *Paraburkholderia*, sua implicação na sustentabilidade de ecossistemas terrestres, adaptabilidade de espécies vegetais, bem como, sua potencial viabilidade biotecnológica.

**Palavras-chave:** *Paraburkholderia*; BPCP; genômica; solubilização de fosfato inorgânico;

## ABSTRACT

Phosphorus (P) is a limiting nutrient for plant species and, consequently, for the balance of ecosystems. In the soil, P is found as phosphate ions associated with metals, which are not susceptible to incorporation by plant species. Phosphate sources can be bioavailable through phosphate solubilization, a process carried out by specialized groups of fungi and bacteria. The objective of this study was to evaluate the ability of phosphate solubilization by rhizobia isolated from root nodules of native leguminous plants from Campos Gerais, Paraná, Brazil, previously characterized genetically and physiologically. Initially, forty strains of the genera *Paraburkholderia*, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* were evaluated, of which fifteen showed solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in solid NBRIP medium. The five strains that showed the highest solubilization indices (IS) were all from the genus *Paraburkholderia*, were quantitatively and genetically characterized for such capacity. These strains had the solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  quantified in liquid NBRIP presenting from 110.67 to 367.6 mg/L of soluble phosphate after seven days of incubation, accompanied by progressive acidification of the pH of the medium. A negative correlation was observed between acidification of the medium and the amount of P solubilized in liquid medium, unlike IS in solid medium. Due to this lack of correlation between the solubilization of phosphate in a liquid medium and in a solid medium, the quantification of the solubilizing capacity in a liquid medium was carried out for two other phosphate sources,  $\text{FePO}_4$  and  $\text{AlPO}_4$ , whose tests in solid medium did not show solubilization on the part of no strain evaluated. These five strains showed solubilization from both sources when cultivated in liquid medium (1.42 to 4.49 mg/L in NBRIP +  $\text{FePO}_4$  and from 3.15 to 6.17 mg/L NBRIP +  $\text{AlPO}_4$ ). This result emphasizes the importance of the tests chosen for the selection of strains with the ability to solubilize phosphate, since, depending on the cultivation conditions and the phosphate sources used, strains that under other conditions could solubilize phosphate can be excluded. These five selected *Paraburkholderia* strains were further cultivated in NBRIP+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  with different carbon sources, where the best IS were obtained with glucose in relation to mannitol and sucrose. Aiming at a better understanding of the genetic determinants of this ability, the sequencing and annotation of the genome of the strain *Paraburkholderia* sp. CNPSo 3281 as well as in silico analysis of genes related to phosphate solubilization of solubilizing species of the genus, including *P. nodosa* and *P. guartelaensis*. There was a relationship between presence/absence of genes and phylogeny of the evaluated *Paraburkholderia*. Genes for acid phosphatases were identified, as well as encoding enzymes active in the production of organic acids, such as *gcd-pqq*, for pyrroloquinoline-dependent glucose dehydrogenase, which is involved in the synthesis of gluconic acid, reported as the main organic acid involved in the solubilization of phosphate, among others. The presence of these genes may be associated with the production of organic acids, reductions in the pH values of cultures of these strains and solubilizing ability. The metabolic versatility of native strains of *Paraburkholderia* is highlighted, deserving further studies regarding its implication in the sustainability of terrestrial ecosystems as well as biotechnological viability.

**Keywords:** *Paraburkholderia*; PGPR; genomic; inorganic phosphate solubilization;

## LISTA DE FIGURAS

|          |                                                                                                                                                   |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Mecanismos de solubilização/mineralização de fosfato por bactérias.                                                                               | 13 |
| Figura 2 | Localização geográfica dos pontos de coleta.....                                                                                                  | 22 |
| Figura 3 | Gráfico representativo da solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de Ca.....                                          | 39 |
| Figura 4 | Gráfico representativo da solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de Fe.....                                          | 40 |
| Figura 5 | Gráfico representativo da solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de Al.....                                          | 41 |
| Figura 6 | Árvore filogenética baseada em sequencias parciais do gene 16S rDNA de espécies solubilizadoras de fosfato do gênero <i>Paraburholderia</i> ..... | 43 |

## LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                          |    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Índices de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP sólido..                                     | 35 |
| <b>Tabela 2</b> | Índices de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP sólido com diferentes fontes de carbono..... | 38 |
| <b>Tabela 3</b> | Correlação de Pearson.....                                                                               | 40 |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                           | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                                                                | <b>11</b> |
| 2.1      | O CICLO BIOGEOQUÍMICO DO FÓSFORO.....                                                                                                            | 11        |
| 2.2      | BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP).....                                                                                       | 11        |
| 2.2.1    | Microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fósforo.....                                                                                 | 12        |
| 2.2.2    | Aspectos genéticos da solubilização/mineralização de fosfato.....                                                                                | 14        |
| 2.3      | O GÊNERO <i>PARABURKHOLDERIA</i> .....                                                                                                           | 15        |
| 2.4      | RIZÓBIOS DO GÊNERO <i>PARABURKHOLDERIA</i> .....                                                                                                 | 17        |
| 2.4.1    | Diversidade de <i>Paraburkholderia</i> nodulíferas dos Campos Gerais do Paraná.....                                                              | 17        |
| <b>3</b> | <b>JUSTIFICATIVA.....</b>                                                                                                                        | <b>19</b> |
| <b>4</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                            | <b>20</b> |
| 4.1      | OBJETIVO GERAL.....                                                                                                                              | 20        |
| 4.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                                       | 20        |
| <b>5</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                   | <b>21</b> |
| 5.1      | MATERIAL BIOLÓGICO.....                                                                                                                          | 21        |
| 5.2      | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO SÓLIDO.....                                                                                     | 23        |
| 5.3      | INFLUÊNCIA DA FONTE DE C NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO....                                                                                         | 24        |
| 5.4      | AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS E PH DO MEIO DE CULTIVO.....                                                                 | 24        |
| 5.5      | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                                                         | 25        |
| 5.6      | SEQUENCIAMENTO DO GENÔMA DA ESTIRPE <i>PARABURKHOLDERIA</i> SP. CNPSO 3281.....                                                                  | 25        |
| 5.7      | ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS A SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO EM <i>PARABURKHOLDERIA</i> SPP. E FILOGENIA DAS ESPÉCIES SOLUBILIZADORAS DO GÊNERO..... | 26        |

|          |                                                                                                                                                                            |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6</b> | <b>SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR RIZÓBIOS DO GÊNERO <i>PARABURKHOLDERIA</i> ISOLADOS DE LEGUMINOSAS NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ (BRASIL).....</b>                  | <b>28</b> |
| 6.1      | INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                            | 28        |
| 6.2      | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                                    | 30        |
| 6.2.1    | Avaliação da capacidade de solubilização em meio sólido.....                                                                                                               | 30        |
| 6.2.2    | Avaliação quantitativa de solubilização de fosfatos e pH do meio de cultivo.....                                                                                           | 31        |
| 6.2.3    | Influência da fonte de C na solubilização de fosfato.....                                                                                                                  | 32        |
| 6.2.4    | Sequenciamento de genoma da estirpe <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3281.....                                                                                            | 32        |
| 6.2.5    | Análise de genes relacionados a solubilização de fosfato em <i>Paraburkholderia</i> e filogenia das espécies solubilizadoras do gênero.....                                | 33        |
| 6.2.6    | Análise estatística.....                                                                                                                                                   | 34        |
| 6.3      | RESULTADOS.....                                                                                                                                                            | 34        |
| 6.3.1    | Avaliação da solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em meio sólido e influência da fonte de carbono.....                                                            | 34        |
| 6.3.2    | Solubilização de $\text{CaPO}_4$ , $\text{AlPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ em meio líquido e efeitos no pH do cultivo.....                                                       | 40        |
| 6.3.3    | Sequenciamento de genoma, anotação de genes relacionados a solubilização de fosfato em <i>Paraburkholderia</i> spp. e filogenia de espécies solubilizadoras do gênero..... | 43        |
| 6.4      | DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                             | 45        |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                      | <b>50</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                    | <b>51</b> |
|          | <b>APÊNDICE A: MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>                                                                                                                               | <b>59</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O fósforo é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, e mesmo estando presente nos solos, as formas em que se apresentam íons fosfato associados a metais ou a orgânicos, não são assimiláveis pelas espécies vegetais nesses ambientes (OTEINO et al., 2015).

Em ecossistemas naturais, a disponibilidade de fósforo, ocorre majoritariamente por bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), que podem colonizar determinadas espécies vegetais e por meio de sua atividade metabólica (produção de ácidos orgânicos, extrusão de prótons, produção de fosfatases, entre outros) são capazes de solubilizar o fosfato, permitindo que seja absorvido pelas plantas. A eficiência na solubilização de fosfato que tais organismos apresentam se deve a atividade de genes que codificam enzimas capazes de catalisar algumas partes do processo, como a glicose desidrogenase e fosfatases ácidas e alcalinas (JI et al., 2019; PRABHU; BORKAR; GARG; 2019).

Entre as BPCP já descritas, se encontra o gênero *Paraburkholderia*, reclassificado de *Burkholderia*, que engloba espécies ambientais usualmente relatadas quanto a sua versatilidade metabólica, incluindo espécies fixadoras de N, degradadoras de xenobióticos e solubilizadoras de fosfato (BERNABEU et al., 2018; LEE et al., 2019; GAO et al., 2019).

Estudos anteriores na região dos Campos Gerais do Paraná, identificaram a presença de espécies de *Paraburkholderia* spp. associadas a leguminosas nativas da região, incluindo a descrição da nova espécie de *P. quartelaensis*, denominada em homenagem ao seu local de origem (PAULITSCH et al., 2019a).

Dentre esses isolados anteriores, esse trabalho identificou a atividade solubilizadora de fosfato e tem em vista compreender melhor a relação ecológica estabelecida entre essas bactérias e suas plantas hospedeiras através da disponibilização de fósforo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O CICLO BIOGEOQUÍMICO DO FÓSFORO

O fósforo (P) é um elemento chave nos ecossistemas por ser componente de biomoléculas essenciais como ácidos nucleicos, lipídeos e polissacarídeos, dentre outros. É considerado um macronutriente limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal. As plantas requerem cerca de  $30 \mu\text{mol l}^{-1}$  de P no solo e, no entanto, apenas cerca de  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$  de P encontra-se disponível para absorção (OTEINO et al., 2015).

Uma vez estando no solo, o fosfato pode ser levado até rios e oceanos pelas chuvas, onde os organismos aquáticos também irão incorporá-lo em sua biomassa pela absorção e alimentação. Os íons que ficam na água podem ser depositados no fundo do rio ou oceano, onde irá se acumular junto aos detritos de rocha que ali se formam (rochas sedimentares). Com o passar dos anos (centenas ou milhares), essas rochas podem se elevar, sofrer erosão e passar a fazer parte do solo, de onde esses íons vieram originalmente (RODRIGUEZ ; FRAGA, 1999; LAPPALAINEN et al., 2016).

O período em que os íons se depositam nas rochas sedimentares até que retornem ao solo é conhecido como ciclo longo ou ciclo de tempo geológico; já o período em que os íons fosfato passam do solo para os organismos vivos e retornam a ele é chamado de ciclo curto ou ciclo de tempo ecológico, no qual estão envolvidos os microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fosfato (RUTTENBERG, 2003).

### 2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

Os microrganismos associados a espécies vegetais podem ser comensais, com nenhuma função reconhecida ao hospedeiro, podem desencadear efeitos positivos (mutualistas) ou negativos (antagonistas), para uma dada espécie vegetal e condição ambiental (HARDOIM et al., 2015). Quanto aos mutualistas, suas atividades benéficas influenciam direta ou indiretamente a composição e produtividade de comunidades vegetais, mesmo em condições ambientais adversas aos hospedeiros (WAGG et al.,

2011; MENDES, 2013). Consequentemente, tais microrganismos são componentes indispensáveis à sustentabilidade dos ecossistemas terrestres.

Bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) interagem de variadas formas com determinada espécie de planta hospedeira, e são capazes de aumentar a produtividade das mesmas por meio de diversas atividades, como aumento da aquisição de nutrientes, modulação hormonal, inibição do crescimento de patógenos, aumento da tolerância a estresses abióticos, dentre outros (JI et al., 2019).

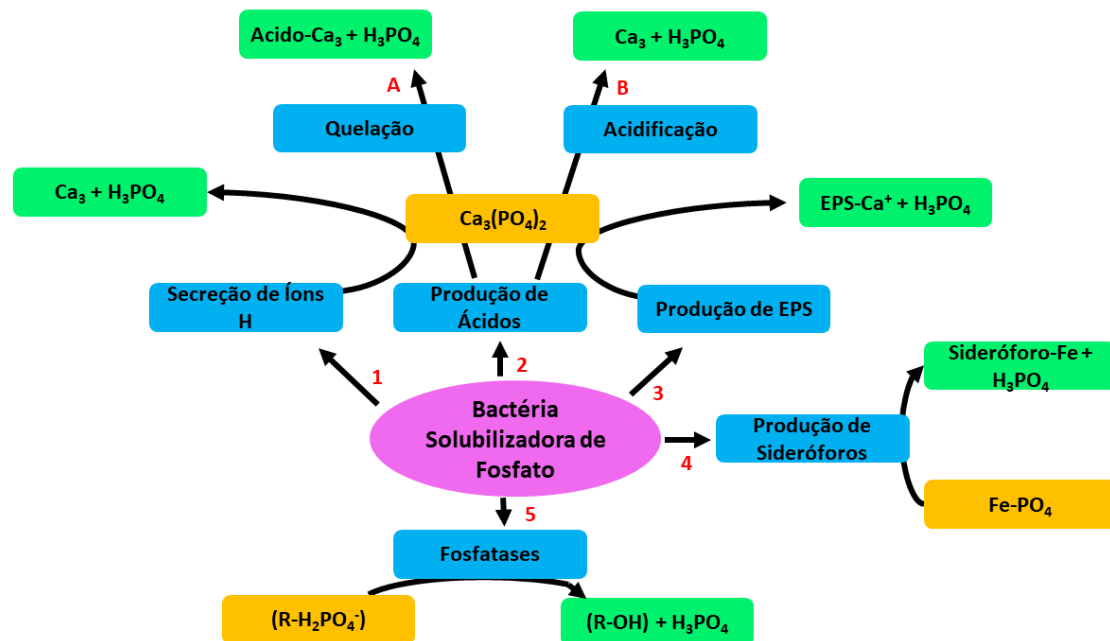
Em geral, as BPCP atuam em três aspectos do crescimento vegetal: (1) sintetizando compostos que modulam o desenvolvimento da planta hospedeira, como fitormônios (auxinas, citocininas e giberelinas), compostos indólicos e enzimas moduladoras (aminociclopropano-1-carboxilato/ACC desaminase); (2) facilitando a aquisição de nutrientes e solubilização de minerais (especialmente nitrogênio e fósforo); (3) prevenindo ou reduzindo a incidência de fitopatógenos (pela produção de enzimas, sideróforos e cianeto) (RAAIJMAKERS et al., 2009; HAYAT et al., 2010). Tais bactérias incluem diversos gêneros de diferentes habitats, que apresentam grande diversidade funcional, ecológica e fisiológica, compondo parte relevante da biota da rizosfera e do solo (CHAUHAN et al., 2015).

Vários gêneros de bactérias já foram descritos como BPCP, entre eles encontram-se: *Pseudomonas*, *Burkholderia/Paraburkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (GLICK, 1995; DOBBELAERE et al., 2003; LUGTENBERG ; KAMILOVA, 2009).

#### 2.2.1 Microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fósforo

O fosfato está presente no solo de duas formas, fosfato orgânico, oriundo da matéria orgânica decomposta, e fosfato inorgânico, originado das rochas. Grupos de microrganismos atuam por meio de diferentes mecanismos na solubilização do P inorgânico e mineralização do P orgânico (Figura 1).

**Figura 1:** Mecanismos de solubilização/mineralização de fosfato em bactérias. (1) Secreção de íons  $H^+$ , onde a bactéria não precisa produzir um ácido, por exemplo, durante a assimilação de amônia no ciclo do nitrogênio a bactéria acaba liberando prótons para o meio. (2) O ácido produzido pela bactéria interage com o metal associado ao fosfato, liberando o mesmo. Isto pode ocorrer na forma de quelantes (A) onde se forma um complexo do ácido com o metal, ou (B) na acidificação do meio. (3) Produção de exopolissacarídeos (EPS) em resposta a estresse bacteriano, que promove uma solubilização de fosfato indireta, onde esses metabólitos secundários se ligam aos metais liberando fosfato. (4) A produção de sideróforos, moléculas que possuem alta afinidade por Fe, separando-o do fosfato. (5) As fosfatases hidrolisam os compostos orgânicos liberando fosfato.



Fonte: modificado de Prabhu; Borkar; Garg, 2019.

Atualmente reconhecemos como principal mecanismo de solubilização de fosfato a produção de ácidos orgânicos, que resulta na acidificação da célula microbiana e seus arredores (Figura 1, item 2) (YADAV et al., 2015). Os microrganismos solubilizadores usualmente produzem os ácidos acético, fórmico, oxálico, succínico, málico, cítrico, glucônico, dentre outros. Este último vem sendo considerado de maior importância no processo de solubilização de fosfato por bactérias e arqueias (YADAV et al., 2015; ALAYAR et al., 2019; LIANG et al., 2020).

Substâncias quelantes de cátions (Ca, Fe e Al), como ácidos húmico e fúlvico, e ácidos inorgânicos, como sulfúrico e nítrico também são eficazes na solubilização de fosfato inorgânico. Também, a produção de exopolissacarídeos (EPS) e sideróforos (substâncias com afinidade a Fe) microbianos podem ter influência indireta na solubilização, porém esses mecanismos ainda não estão detalhados (PRABHU; BORKAR; GARG, 2019).

Com relação à mineralização do P, a decomposição de matéria orgânica no solo é realizada pela ação de numerosos organismos saprófitos, que realizam a liberação de ortofosfato radical da estrutura de carbono. Para que o P solúvel esteja disponível no solo, é necessária a atividade enzimática da fosfatase microbiana (Figura 1), que hidrolisa o P orgânico em P inorgânico (MCGRATH et al., 1995; PRABHU; BORKAR; GARG, 2019).

A mineralização desses compostos é realizada por meio da ação de várias fosfatases, que são classificadas como ácidas ou alcalinas de acordo com o pH em que apresentam suas atividades catalíticas. As reações de desfosforilação envolvem a hidrólise das ligações fosfodiéster ou fosfoanidreto. (ROSSOLINI et al., 1998).

### 2.2.2 Aspectos genéticos da solubilização/mineralização de fosfato

No metabolismo de solubilização de fosfato são relatados na literatura alguns genes com produtos chave para essas captações e transformações moleculares. Dentre eles, estão os genes *gcd*, que codifica a glicose desidrogenase (RODRIGUEZ, 2006; LIANG, 2020; RAWAT et al., 2020; YADAV et al., 2020; YOU et al., 2020) também relacionado a produção de ácido gluconico, que tem papel essencial na solubilização de fosfatos inorgânicos (SANTOS-TORRES et al., 2021).

Na solubilização de fosfatos orgânicos temos a presença de fosfatases alcalinas, vindas dos genes *phoA* e *phoD* (APEL et al., 2007; LIANG et al., 2020; SANTOS-TORRES et al., 2021), fosfatases ácidas, relacionadas ao gene *phoC* (APEL, et al. 2007; FRASER, et al. 2016) e por fim fosfonatases, responsáveis pela clivagem entre C-P, resultante do gene *phnX* (DUMORA, 1997). A Tabela 1 mostra uma seleção de genes relacionados a solubilização de fosfato encontrados na literatura.

**Quadro 1:** Principais grupos de enzimas bacterianas envolvidas na solubilização de fosfato, segundo dados da literatura. Os nomes dos genes que codificam as enzimas podem variar de acordo com a espécie bacteriana.

| Genes                                                                                                          | Produtos                       | Referências                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Enzimas que catalisam a hidrólise de esteres e anidros de ácido fosfórico que fazem a mineralização de fosfato |                                |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>aphA</i> ,<br><i>opIA</i> ,<br><i>phoC</i>                                                                  | Fosfatase ácida                | ROSSOLINI et al., 1998; APEL et al., 2007; FRASER et al., 2016; LIANG et al., 2020; RAWAT et al., 2020; SANTOS-TORRES et al., 2021;                                                                                                                              |
| <i>phoD</i> ,<br><i>phoX</i> ,<br><i>phoA</i>                                                                  | Fosfatase alcalina             |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Enzimas envolvidas na produção de ácido glucônico                                                              |                                |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>gcd</i>                                                                                                     | Glicose desidrogenase          | RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; RODRIGUEZ et al., 2006; PEREZ et al., 2007; LIDBURY et al., 2016; LYER et al., 2019; RAWAT et al., 2020; ALAYAR et al., 2020; LIANG, et al. 2020; YADAV et al., 2020; SILVA et al., 2021; KOUR et al., 2021; SANTOS-TORRES et al., 2021; |
| <i>pqq</i>                                                                                                     | Pirroloquinolina quinona       |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>gnl</i>                                                                                                     | gluconolactonase               |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>gnd</i>                                                                                                     | 6 fosfogluconato desidrogenase |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Enzimas relacionadas a sinalização e transporte de fosfato (Pi)                                                |                                |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>pstSCAB</i>                                                                                                 | Complexo de transporte de Pi   | RODRIGUEZ et al., 1999; APEL et al., 2007; LIDBURY et al., 2016; SILVA et al., 2021; LIU et al., 2020; YOU et al., 2020; ZENG et al. 2017.                                                                                                                       |
| <i>phoUBR</i>                                                                                                  | Sistema de sinalização de Pi   |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Enzimas envolvidas no catabolismo de polifosfatos                                                              |                                |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>ppk</i>                                                                                                     | Polifosfato quinase            | CARDONA et al., 2002; MULLAN et al., 2002; SILVA et al., 2021;                                                                                                                                                                                                   |
| <i>ppx</i>                                                                                                     | Exopolifosfatase               |                                                                                                                                                                                                                                                                  |

## 2.3 O GÊNERO PARABURKHOLDERIA

Várias espécies do gênero *Paraburkholderia* são classificadas como BPCP. Esse gênero é resultado da reclassificação de *Burkholderia* lato sensu (l.s.). *Burkholderia* l.s. caracteriza-se por ser cosmopolita e metabolicamente versátil (COMPANT et al., 2008), abrigando espécies ambientais e patógenos de humanos e

animais, sendo bastante conhecida e estudada devido a sua importância clínica (VANDAMME; COENYE, 2004; BALDER et al., 2010).

Estrada-De Los Santos et al. (2013), em estudo filogenômico de bactérias do gênero *Burkholderia*, observaram que o gênero poderia ser dividido em dois grupos e que tal classificação acompanhava características ecológicas e fenotípicas das espécies analisadas. Sawana et al. (2014) e Dobritsa; Samadpour (2016) propuseram a transferência de todas as espécies ambientais (inclusive os beta-rizóbios) para os novos gêneros *Paraburkholderia* e *Caballeronia*, enquanto as espécies reconhecidas como patógenos de plantas e animais permaneceriam como gênero *Burkholderia*.

Bactérias do gênero *Paraburkholderia* são usualmente relatadas quanto à sua versatilidade metabólica, compreendendo espécies fixadoras de N associativas (BERNABEU et al., 2018) e endossimbióticas (PAULITSCH et al., 2019b, 2020); degradadoras de xenobióticos (LEE; JEON et al., 2019); solubilizadoras de fosfato (GAO et al., 2019), dentre outras atividades de grande importância ambiental. É importante salientar que a eficiência na atividade solubilizadora de fosfato é usualmente atribuída a espécies associativas de BPCP do gênero e não a endossimbióticas (rizóbios).

Genes de virulência, relacionados à patogenia em animais e vegetais, não foram detectados em *Paraburkholderia*, porém estudos para averiguar a possibilidade da presença ou obtenção via THG desses genes ainda são escassos. Angus et al. (2014) demonstraram que as espécies que realizam relações simbióticas com plantas não possuem os genes necessários para desencadear patogenia em mamíferos. No entanto, recomenda-se que, para a utilização de espécies com finalidades biotecnológicas, estudos devem ser realizados para analisar o potencial patogênico das mesmas (KAUR et al., 2016).

Os determinantes genotípicos da versatilidade ecológica de *Paraburkholderia* são atribuídos ao tamanho de seus genomas e distribuição das sequências de inserção, que favorecem sua adaptabilidade (O'SULIVAN, 2005; VIO et al., 2020; PAULITSCH et al., 2021).

## 2.4 RIZÓBIOS DO GÊNERO *PARABURKHOLDERIA*

Apesar do nitrogênio (N) ser o principal constituinte da atmosfera, o mesmo se encontra em sua forma molecular, inerte para a maioria dos seres vivos. Algumas espécies de procariotos, denominados diazotróficos, realizam a conversão enzimática do N<sub>2</sub> em amônia, passível de assimilação pelas plantas, em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Os microrganismos diazotróficos podem estabelecer diferentes níveis de interação com espécies vegetais. Dentre os mesmos estão os rizóbios, grupo filogeneticamente diverso de bactérias diazotróficas do solo que tem a habilidade de formar nódulos radiculares e fixar N atmosférico em associações endossimbióticas com plantas da família Fabaceae (= Leguminosae) (WANG et al., 2011; TAULÉ et al., 2012).

Atualmente, reconhece-se que os rizóbios pertencem a duas classes distintas de Proteobacteria: Alfaproteobacteria e Betaproteobacteria sendo chamados respectivamente de alfa-rizóbios e beta-rizóbios (WANG et al., 2011; TAULÉ et al., 2012). Os alfa-rizóbios incluem os rizóbios clássicos, reconhecidos e estudados a cerca de 130 anos, especialmente por sua interação com espécies vegetais de importância agrícola e são distribuídos em vários gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer*, entre outros). Os beta-rizóbios foram descritos apenas no início do século XXI e são relatados como simbiontes de espécies nativas de leguminosas (MOULIN et al., 2001). Atualmente os beta-rizóbios encontram-se classificados nos gêneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Trinickia* (VANDAMME ; COENYE, 2004; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2013; DOBRITSA ; SAMADPOUR, 2016).

O conhecimento sobre a diversidade, ecologia e aspectos evolutivos dos beta-rizóbios ainda são preliminares quando comparados aos rizóbios clássicos.

### 2.4.1 Diversidade de *Paraburkholderia* nodulíferas dos Campos Gerais do Paraná

Na América do Sul, rizóbios do gênero *Paraburkholderia* foram predominantemente isolados no Brasil, associados com espécies endêmicas e nativas de *Mimosa* spp., nos biomas Cerrado e Caatinga, sendo consideradas os seus

simbiontes preferenciais (DOS REIS et al., 2010; SIMON et al., 2011). Estudos envolvendo o isolamento de *Paraburkholderia* de diversas espécies de *Mimosa* no Brasil sugerem que a associação íntima entre ambas é resultado de um evento de coevolução e diversificação, sendo o Brasil um centro de diversidade de ambos os simbiontes (BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS et al., 2010; MOULIN et al., 2015; PAULISTSCH et al., 2019a; KLEPA et al., 2021).

Estudos prévios indicam que os Campos Gerais do Paraná possuem uma diversidade única de *Paraburkholderia* nodulíferas, associadas a plantas leguminosas nativas/endêmicas da região (PAULTISCH et al., 2019a; PAULTISCH et al., 2019b; KLEPA et al., 2021; PROTACHEVICZ et al., submetido). Paulitsch e colaboradores (2019a) analisaram a diversidade genética baseada em filogenia do gene 16S rDNA, DNA *fingerprinting* e MLSA de rizóbios isolados de nódulos radiculares de *Mimosa gymnas*, nativas do Parque Estadual do Guartelá. Além do isolamento de *P. nodosa*, o estudo apontou que um grupo de estirpes não foi classificada em nenhuma das espécies conhecidas do gênero. Esse grupo foi posteriormente utilizado para a descrição da nova espécie *P. guartelaensis*, nomeada em homenagem ao seu local de isolamento (PAULTISCH et al., 2019b).

Klepa et al. (2021) indicam possível ocorrência de outras novas espécies de *Paraburkholderia* em estudo sobre a diversidade genética de simbiontes de *M. micropteris* e *M. paranapiacabae*, amostradas no Parque Estadual de Vila Velha e Parque Estadual do Guartelá, respectivamente.

Tais resultados apontam que, além da já reconhecida diversidade e endemismo de espécies de plantas da família Fabaceae nos Campos Gerais do Paraná, também existe muita novidade dentre os rizóbios cognatos em condições naturais.

Uma dessas novidades foi o isolamento inédito de beta-rizóbios de plantas do gênero *Desmodium*, nativas de diferentes unidades de conservação dos Campos Gerais. Protachevycz et al. (submetido) analisaram a diversidade de rizóbios isolados de *D. barbatum*, *D. incanum* e *D. discolor*, descrevendo a ocorrência de *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e, de forma inédita, *Paraburkholderia*.

### 3 JUSTIFICATIVA

O Brasil apresenta uma grande diversidade de beta-rizóbios do gênero *Paraburkholderia*, os quais são principalmente encontrados em associação com espécies endêmicas e nativas de *Mimosa*, sendo considerado um reservatório de espécies simbióticas do gênero. Onze diferentes espécies de rizóbios do gênero foram primeiramente isolados no país (*P. mimosarum*; *P. guartelaensis*; *P. atlantica*; *P. nodosa*; *P. sabiae*; *P. phenoliruptrix*; *P. diazotrophica*; *P. piptadeniae*; *P. ribeironis*; *P. franconis*; *P. youngii*) das 21 descritas como simbiossintetizantes de leguminosas, reafirmando a importância da busca pelo entendimento destas espécies e seu papel nos ecossistemas em que estão inseridas (Paulitsch et al., 2021).

Recentemente, Gao et al. (2019) descreveram a nova espécie *P. phosphatilytica*, isolada de solos florestais da China, cujo nome foi conferido em referência à sua capacidade de solubilização de fosfato. A mesma atividade foi descrita em estirpes diazotróficas associativas de *P. tropica*, sendo reportada como mecanismo chave na promoção de crescimento de diferentes espécies vegetais de importância agrícola (BERNABEU et al., 2015).

Hainosz (2020) identificou em análises preliminares, em alguns isolados de *Paraburkholderia* dos Campos Gerais do Paraná a habilidade de crescimento em pH ácido (3,0 a 4,5), a presença de atividade solubilizadora de fosfato. Considerando estes dados prévios obtidos pelo Laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa, e a associação destes microrganismos com plantas pioneiras dos ecossistemas em que estão inseridos, novos dados sobre estes isolados poderão fornecer uma maior compreensão sobre a importância ecológica das interações planta-microrganismo em seus ambientes naturais, bem como representar novas estratégias biotecnológicas sustentáveis para agroecossistemas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação qualitativa, quantitativa e genética da capacidade de solubilização de fosfatos por estirpes de rizóbios isolados de nódulos radiculares de leguminosas nativas de Unidades de Conservação dos Campos Gerais do Paraná.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos em rizóbios nativos dos Campos Gerais;
- Selecionar rizóbios que foram eficientes nas análises preliminares para ensaios quantitativos;
- Verificar a correlação entre pH do meio extracelular com índices de solubilização de fosfato em placa e em meio líquido;
- Realizar análise genômica da atividade de solubilização/mineralização de fosfato no gênero *Paraburkholderia*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para o presente estudo, foram utilizados rizóbios dos gêneros *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, isolados de plantas dos gêneros *Mimosa* e *Desmodium* nativas de diferentes unidades de conservação dos Campos Gerais (Tabela 2). A localização geográfica dos pontos de amostragem está apresentada na Figura 2 e os dados da caracterização físico-química dos solos presentes na Tabela 3.

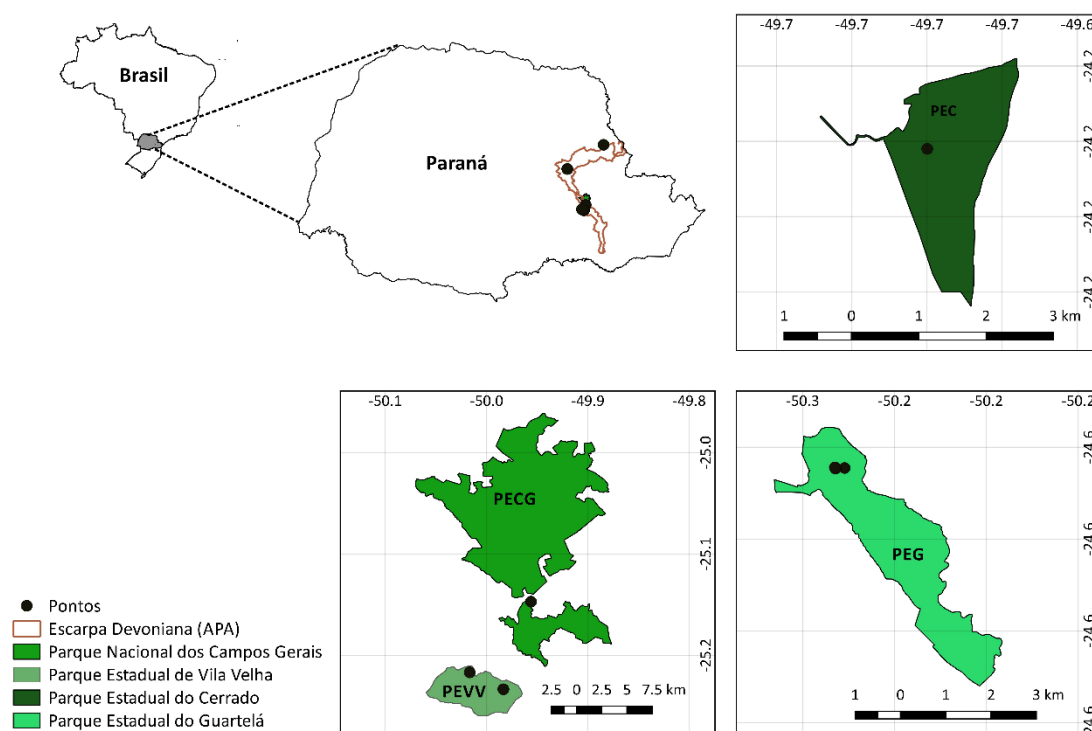
As estirpes foram depositadas na “Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais” da Embrapa Soja (Londrina-PR) e foram previamente caracterizadas filogeneticamente por taxonomia polifásica (PAULITSCH et al., 2019a; PAULITSCH et al., 2019b; KLEPA et al., 2021; PROTACHEVICZ et al., submetido). As bactérias (Tabela 2) foram repicadas de estoque em glicerol em meio de cultivo YM (0,5 g/L  $K_2HPO_4$ , 0,2 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 g/L NaCl; 5 g/L manitol, 0,4 g/L extrato de levedura, 17 g/L ágar e 10 ml vermelho congo) (VINCENT, 1970) previamente armazenadas no Laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

**Quadro 2:** Estirpes de rizóbios isolados de nódulos radiculares de *Mimosa* spp. e *Desmodium* spp. nativos dos Campos Gerais do Paraná.

| Estirpe                                                   | Local de coleta <sup>1</sup> |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>Simbiontes de <i>D. barbatum</i><sup>2</sup></b>       |                              |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3509                    | VV1                          |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3474                    | PC2                          |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3479                    | FG1                          |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3480                    | FG1                          |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 3503                      | FG1                          |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 3504                      | PC1                          |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 3512                      | PC1                          |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 3588                      | FG1                          |
| <i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3586                           | FG1                          |
| <i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3476                           | PC2                          |
| <b>Simbiontes de <i>M. gymnas</i><sup>3</sup></b>         |                              |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3006*                              | G3                           |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3011                               | G1                           |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 2998*                              | G1                           |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3009                               | G2                           |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3019                               | G1                           |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3186                               | G3                           |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3032                               | G3                           |
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3008 <sup>T</sup>           | G2                           |
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3016                        | G2                           |
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3023                        | G2                           |
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 2995                        | G3                           |
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3003*                       | G2                           |
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3248                        | G3                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3247                    | G1                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3241                    | G1                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3010                    | G3                           |
| <b>Simbiontes de <i>M. micropteris</i><sup>4</sup></b>    |                              |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3034                    | VV2                          |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3057                    | VV2                          |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3058                    | VV2                          |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3077                    | VV2                          |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3076*                   | VV2                          |
| <b>Simbiontes de <i>M. paranapiacabae</i><sup>4</sup></b> |                              |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3281*                   | G3                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3274                    | G3                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3268                    | G3                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3270                    | G3                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3272                    | G3                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3273                    | G3                           |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3278                    | G3                           |

<sup>1</sup>Os pontos de coleta podem ser identificados na Figura 2. <sup>2</sup>Maiores informações sobre as estirpes disponíveis em Protachevicz et al., submetido. <sup>3</sup>Maiores informações sobre as estirpes disponíveis em Paulitsch et al, 2019a; Paulitsch et al, 2019b <sup>4</sup>Maiores informações sobre as estirpes disponíveis em Klepa et al., 2021. \*Estirpes de destaque em solubilização de fosfato.

**Figura 2:** Localização geográfica dos pontos de coleta de plantas leguminosas nativas dos Campos Gerais, hospedeiras dos microrganismos estudados.



Fonte: HAINOSZ, 2020.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

As bactérias foram inoculadas em meio YM líquido, até atingirem  $DO_{600}$  entre 0,7 e 0,8 (600 nm). Alíquotas de 10  $\mu$ L foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido NBRIP (10 g/L glicose, 5 g/L  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,25 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 g/L KCl, 0,1 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ) (NAUTIYAL, 1999) acrescido das seguintes fontes de fosfato:  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $FePO_4$  e  $AlPO_4$  (todas a uma concentração de 5 g/L) e este último com dois valores de pH distintos de 4,5 e 7,0 (MARRA, et al. 2012). As placas de Petri inoculadas contendo as diferentes fontes de fosfato foram incubadas a 28°C por 21 dias em BOD (*logen scientific*).

Após 3, 7, 15 e 21 dias de incubação, avaliou-se a capacidade de solubilização de fosfato pelo índice de solubilização (IS), que consiste na razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro das colônias. O experimento foi realizado em triplicata.

### 5.3 INFLUÊNCIA DA FONTE DE C NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

Para as análises seguintes, foram selecionadas as bactérias caracterizadas como mais eficientes para solubilização de fosfato, ou seja, as que apresentarem os maiores valores de IS em menor tempo.

As bactérias foram cultivadas em meio NBRIP +  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (que originalmente contém 10 g/L de glicose) com as seguintes modificações: 40 g/L de glicose (BATISTA, et al, 2018) substituição da glicose por 10 g/L de manitol; substituição da glicose por 10 g/L de sacarose. Após 3, 7, 15 e 21 dias de incubação, avaliou-se a capacidade de solubilização de fosfato pelo IS. O experimento foi realizado em triplicata.

### 5.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS E PH DO MEIO DE CULTIVO

A quantificação dos níveis de fósforos solúveis foi realizada pelo método do fosfomolibdato (MARRA et al., 2012) utilizando meio de cultivo líquido NBRIP acrescido de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  ou  $\text{AlPO}_4$ , todos a 5 g/L como única fonte de P de acordo com o fosfato a ser quantificado.

Inoculou-se 20 ml de meio NBRIP líquido acrescido da fonte de fosfato, com 0,2 ml de cultura bacteriana ajustadas entre  $\text{DO}_{600} = 0,7 - 0,8$  (600 nm).

Os cultivos foram incubados sob agitação, a 28°C por períodos de 3 e 7 dias. As amostras foram centrifugadas a 1680 xg por 10 minutos e filtradas (papel Whatman nº 42). Alíquotas de 0,5 ml do filtrado foi misturado com 1 ml de solução mix de 125 ml de ácido sulfúrico (12%), 75 ml de ácido ascórbico ( $0,099 \text{ mol/L}^{-1}$ ), 37,5 ml de molibdato de amônio ( $0,03 \text{ mol/L}^{-1}$ ) e 12,5 ml de tartarato de antimônio-potássio ( $4,1071 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}^{-1}$ ) (MARRA et al., 2012) e 5 ml de água ultra pura. Após 20 minutos, a intensidade da cor azul foi avaliada em espectrofotômetro (Thermoscientific GENESYS 50) a 880 nm e a quantidade de fosfato solubilizado foi calculado utilizando uma curva padrão.

A curva padrão de fosfato foi preparada com fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), em oito concentrações (1,2 mg/L, 2,4 mg/L, 4,8 mg/L, 6,0 mg/L, 8,0 mg/L, 10 mg/L, 12 mg/L, 14 mg/L). Todas as leituras em espectrofotômetro foram realizadas em triplicatas.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas biológicas e cada repetição biológica foi avaliada em triplicata experimental, sendo utilizado como controle, o meio NBRIP líquido acrescido de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$   $\text{FePO}_4$  ou  $\text{AlPO}_4$ , todos a 5 g/L sem inoculação das estirpes em estudo.

A capacidade de cada estirpe em solubilizar o fósforo foi determinada pela diferença entre a quantidade de fósforo solúvel encontrada no meio de cultura com a bactéria inoculada e a quantidade presente no meio de controle.

O pH do sobrenadante foi medido nos mesmos períodos (3 e 7 dias) utilizando medidor digital (KASVI-K39-1014B).

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises de solubilização em meio sólido, quantificação de solubilização de fosfato em meio líquido, pH do cultivo líquido, e influência da fonte de C na solubilização, foram utilizados dados em triplicatas e comparados usando a análise de variância Scott-Knott (5%) no programa SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2019).

Entre as análises de índice de solubilização de fosfato (halo/colônia) em meio sólido, quantificação de fosfato solubilizado em meio líquido e pH dos meios de cultura, foi feita correlação de Pearson, com o objetivo de indicar como as variáveis estão correlacionadas entre si. Foi utilizado software R (v. 4.1.0).

## 5.6 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DA ESTIRPE *PARABURKHOLDERIA* SP. CNPSO 3281

O DNA total da estirpe selecionada *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 foi extraído usando o Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) seguindo instruções do fabricante. A preparação da biblioteca genômica foi feita com o Nextera Kit XT de acordo com as instruções do fabricante. O processamento da biblioteca genômica foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina) da Embrapa Soja, Londrina, Paraná. O esboço do genoma foi montado com o pipeline A5-MiSeq v.20140604. O genoma teve seu tamanho estimado com *RAST* v.2.0 (Aziz et al. 2008) e confirmado com *QUAST* v.2.0 (Guerevich et al, 2013). Para determinar o conteúdo G+C do DNA da estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 foi usado *QUAST* (Gurevich et al. 2013). O genoma foi depositado na plataforma *RAST* (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>).

## 5.7 ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS A SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO EM *PARABURKHOLDERIA* SPP. E FILOGENIA DAS ESPÉCIES SOLUBILIZADORAS DO GÊNERO.

Foram analisados os genomas de espécies de *Paraburkholderia* que apresentaram relatos de solubilização de fosfato, *P. tuberum* LMG 21444<sup>T</sup>, *P. silvatlantica* SRCL-318, *P. unamae* SCZa-39 (ANGUS, et al, 2013.), *P. fungorum* LMG 16225<sup>T</sup> (OLIVEIRA-LONGATTI, et al, 2014), *P. kururiensis* LMG 19447<sup>T</sup> (ESTRADA, et al. 2012), *P. phosphatilytica* 7QSK02<sup>T</sup> (GAO, et al. 2018), *P. bryophila* LMG 23644<sup>T</sup>, *P. megapolitana* LMG 23650<sup>T</sup> (VANDAMME, et al. 2007) e *P. tropica* Ppe8 (CASTRO-GONZALLES, et al. 2011). Vale ressaltar que foram selecionadas para busca genômica as estirpes tipo de cada espécie e não necessariamente a estirpe que os trabalhos relatavam como sendo solubilizadoras, com exceção para *P. unamae* e *P. silvatlantica* que os genomas das estirpes tipo não estavam disponíveis em bancos de dados.

Os genomas de *P. nodosa* BR3437<sup>T</sup> e *P. guartelaensis* CNPSO 3008<sup>T</sup> foram incluídos na análise devido à alta similaridade genética com estirpes de destaque neste estudo (*Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281; *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3076; *P. nodosa* CNPSO 3003; *P. nodosa* CNPSO 3006 e *P. nodosa* CNPSO 2998). Como a estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 possui classificação taxonômica ainda contraditória, podendo até mesmo representar uma nova espécie do gênero, seu genoma foi sequenciamento no presente estudo conforme descrito no item 5.6.

A anotação foi feita na plataforma RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), onde os genomas foram depositados e, pela ferramenta *Genome Browser*, com o nome dos produtos e o dos genes de interesse. Para confirmação dos resultados encontrados foi feita verificação dos “enzyme commission number” (*EC number*) disponíveis na plataforma *Expasy* (<https://enzyme.expasy.org/>). Alguns genes são mostrados pelo RAST como hipotéticos, e por isso foi realizada nova busca pelas sequências no *CDD* (*Conserved Domains Database*) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), onde obtivemos mais informações sobre alguns domínios proteicos.

A busca foi focada em genes relacionados a solubilização de fosfato registrados na literatura para as estirpes estudadas neste trabalho e nas demais a análise voltou-se para os genes *gcd*, codificador de glicose desidrogenase, *pqq*, codificador da

pirroloquinolina quinona, *phoUBR*, um regulon para proteínas regulatórias da via de sinalização de P, *pstSCAB*, um regulon do complexo de transporte de fosfato, *ppk*, codificante da exopolifosfatase, *ppx*, que codifica a enzima polifosfato quinase, bem como a presença de fosfatases ácidas e alcalinas.

Para alinhamento dos genomas e construção da árvore filogenética do gene 16S DNAr, foi utilizado o programa *MEGA* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, v. 6.1), o algoritmo de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura 3-parametros (TAMURA, 1992) com distribuição de G+I (TAMURA et al. 2013). O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992).

## 6 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR RIZÓBIOS DO GÊNERO *PARABURKHOLDERIA* ISOLADOS DE LEGUMINOSAS NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ (BRASIL).

### Resumo

Espécies vegetais são beneficiadas pela interação com microrganismos promotores do crescimento de plantas que possuem a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos em formas possíveis de assimilação. Rizóbios do gênero *Paraburkholderia* isolados de nódulos radiculares de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná-Brasil foram avaliados genética e fisiologicamente quanto a habilidade de solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em meio NBRIP sólido, onde selecionou-se cinco estirpes que apresentaram maiores índices de solubilização (IS), e não foi identificada solubilização de  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$ , em meio sólido. Essas estirpes tiveram a solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$  quantificadas em NBRIP líquido apresentando de 110,67 a 367,6 mg/L de fosfato solúvel em NBRIP +  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , de 1,42 a 4,49 mg/L em NBRIP +  $\text{FePO}_4$  e de 3,15 a 6,17 mg/L NBRIP +  $\text{AlPO}_4$ , em sete dias de incubação, acompanhados de acidificação do pH do meio. Observou-se correlação negativa entre acidificação do meio e quantidade de P solubilizado em meio líquido, diferentemente do IS em meio sólido. Essas cinco estirpes de *Paraburkholderia* selecionadas também foram cultivadas em NBRIP+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  com diferentes fontes de carbono, onde os melhores IS foram obtidos com glicose em relação ao manitol e sacarose. Foi realizado o sequenciamento e anotação do genoma da estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 bem como análise *in silico* de genes relacionados a solubilização de fosfato de espécies solubilizadoras do gênero, incluindo *P. nodosa* e *P. guartelaensis*. Verificou-se uma relação entre presença/ausência de genes e filogenia das *Paraburkholderia* avaliadas. Foram identificados genes codificadores de enzimas atuantes na produção de ácidos orgânicos, como *gcd-pqq*, para glicose desidrogenase dependente de pirroloquinolina, que está envolvida na síntese de ácido gluconico. A solubilização de fosfato por bactérias do gênero *Paraburkholderia* pode estar relacionada a maior tolerância a pH ácido, considerando a implicação da produção de ácidos orgânicos nesse processo. Fica claro a versatilidade metabólica de estirpes nativas de *Paraburkholderia* e sua implicação na sustentabilidade de ecossistemas terrestres, adaptabilidade de espécies vegetais, e sua potencial viabilidade biotecnológica.

**Palavras-chave:** *Paraburkholderia*; BPCP; genômica; solubilização de fosfato inorgânico

### 6.1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais interagem com bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), grupo de procariotos taxonomicamente diverso que coloniza uma espécie hospedeira e são capazes de estimular a produtividade das mesmas por meio de diversas atividades, como aumento da aquisição de nutrientes (especialmente P e

N), modulação hormonal, inibição do crescimento de patógenos, aumento da tolerância a estresses abióticos, dentre outros (JI et al., 2019).

O termo BPCP envolve diversos gêneros de diferentes habitats que apresentam grande diversidade funcional, ecológica e fisiológica (CHAUHAN et al., 2015) e compõem parte indispensável da microbiota da rizosfera e do solo.

Uma das mais notórias atividades promotoras do crescimento é a solubilização de fosfato. Isso porque o fósforo (P) é um componente de biomoléculas essenciais e, portanto, é um macronutriente limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Mesmo estando presente nos solos, se apresentam como íons fosfato associados a metais ou a compostos orgânicos, não passível de assimilação pelas espécies vegetais (OTEINO et al., 2015).

Grupos de microrganismos atuam por meio de mecanismos distintos na solubilização do P, e em bactérias tem-se conhecimento da produção de ácidos orgânicos (YADAV et al., 2015), produção de exopolissacarídeos, sideróforos e secreção de íons  $H^+$  (PRABHU, et al. 2019) para solubilização de fosfato inorgânico e a produção de fosfatases ácidas ou alcalinas para mineralização de fosfato orgânico (ROSSOLINI et al., 1998; PRABHU et al., 2019).

Alguns dos genes bacterianos reconhecidamente envolvidos nesse processo são: o *gcd* codificante para glicose desidrogenase, e seu cofator, a pirroloquinolina quinona, codificada pelo gene *pqq*, que atuam na via de oxidação da pentose, tendo como um resíduo metabólico, o ácido glucônico, tido como principal ácido produzido na solubilização de fosfato (LIU et al., 1992; RAJKUMAR et al., 2019); *pstSCAB* que codifica um complexo de transporte de fosfato, que é utilizado quando as células necessitam de fosfato; *phoUBR* operon regulador da sinalização de fosfato, que induz a produção de fosfatases em caso de ausência de fosfato no meio (RODRIGUEZ et al., 1999); *ppk* que codifica a polifosfato quinase, atuante na fosforegulação oxidativa, para a formação de polifosfato (MULLAN et al., 2002) e *ppx* uma exopolifosfatase que atua na hidrólise de polifosfato, (YOU et al., 2020; SANTOS-TORRES et al., 2021; SILVA et al., 2021).

Várias espécies do gênero *Paraburkholderia* são classificadas como BPCP, usualmente relatadas quanto à sua versatilidade metabólica, compreendendo espécies fixadoras de N associativas (BERNABEU et al., 2018) e endossimbióticas (rizóbios) (PAULITSCH et al., 2019b, 2020); degradadoras de xenobióticos (LEE ; JEON. et al.2019) e inclusive com habilidade de solubilização de fosfato, como *P.*

*phosphatilytica* (GAO et al., 2019) *P. tuberum*, *P. silvatlantica*, *P. unamae* (ANGUS et al., 2013.), *P. fungorum* (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014), e *P. kururiensis* (ESTRADA et al., 2012). De fato, algumas espécies são multifuncionais por integrarem diferentes habilidades na promoção do crescimento de plantas.

O Brasil é um centro de diversidade do gênero *Paraburkholderia* e estudos prévios indicam que os Campos Gerais do Paraná possuem uma diversidade única de *Paraburkholderia* nodulíferas, associadas a plantas leguminosas nativas/endêmicas da região (PAULTISCH et al., 2019a; PAULTISCH et al., 2019b; KLEPA et al., 2021; PROTACHEVICZ et al., submetido). Análises preliminares com isolados de *Paraburkholderia* dos Campos Gerais do Paraná indicaram atividade solubilizadora de fosfato e elevada tolerância a pH ácidos (HAINOSZ, 2020). Novos dados sobre essa habilidade metabólica destes microrganismos são necessários para uma compreensão maior da importância ecológica das interações planta-microrganismo nesses ambientes.

O presente estudo descreve a habilidade em solubilizar fosfatos inorgânicos por estirpes de rizóbios isolados de nódulos radiculares de leguminosas nativas de Unidades de Conservação dos Campos Gerais do Paraná, Brasil. Os resultados das análises iniciais apontaram uma maior eficiência de bactérias do gênero *Paraburkholderia*, que foram utilizadas para maior detalhamento fenotípico e genômico do processo.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Avaliação da capacidade de solubilização em meio sólido

Para o presente estudo, foram utilizados rizóbios dos gêneros *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. As estirpes foram depositadas na “Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais” da Embrapa Soja (Londrina-PR). As bactérias (Tabela 2) foram obtidas de estoque em glicerol e em meio de cultivo YM (0,5 g/L  $K_2HPO_4$ , 0,2 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 g/L NaCl; 5 g/L manitol, 0,4 g/L extrato de levedura, 17 g/L ágar e 10 ml vermelho congo) (VINCENT, 1970) previamente armazenadas no Laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As bactérias foram inoculadas em meio YM líquido, até atingirem  $DO_{600}$  entre 0,7 e 0,8 (600 nm). Alíquotas de 10  $\mu$ L foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido NBRIP (10 g/L glicose, 5 g/L  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,25 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 g/L KCl, 0,1 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ) (NAUTIYAL, 1999) acrescido das seguintes fontes de fosfato:  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $FePO_4$  ou  $AlPO_4$  (todas a uma concentração de 5 g/L), e este último com dois valores de pH distintos de 4,5 e 7,0 (MARRA, et al. 2012). As placas de Petri inoculadas contendo as diferentes fontes de fosfato foram incubadas a 28°C por 21 dias em BOD (*logen scientific*).

Após 3, 7, 15 e 21 dias de incubação, avaliou-se a capacidade de solubilização de fosfato pelo índice de solubilização (IS), que consiste na razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro das colônias. O experimento foi realizado em triplicata

#### 6.2.2 Avaliação quantitativa de solubilização de fosfatos e pH do meio de cultivo

A quantificação dos níveis de fósforos solúveis foi realizada pelo método do fosfomolibdato (MARRA et al., 2012) em meio de cultivo líquido NBRIP acrescido de  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $FePO_4$  e  $AlPO_4$  (5 g/L) como única fonte de P, onde 20 ml de meio NBRIP líquido foram incubados com 0,2 ml de cultura bacteriana ajustadas entre  $DO_{600}$  7,0 e 8,0 (600 nm), mantidos em agitação por 7 dias a 28°C.

Aos períodos de 3 e 7 dias, o sobrenadante das amostras foram retirados e analisados pelo método do fosfomolibdato (MARRA et al., 2012) em espectrofotômetro (*thermoscientific GENESYS 50*) a 880 nm e a quantidade de fosfato solubilizado foi calculado pela curva padrão. A curva padrão de fosfato foi preparada com fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ), em oito concentrações. Todas as leituras em espectrofotômetro foram realizadas em triplicatas.

O pH do sobrenadante foi medido nos mesmos períodos (3 e 7 dias) por medidor digital (KASVI-K39-1014B).

Todas as análises foram realizadas em triplicatas biológicas e cada repetição biológica foi avaliada em triplicata experimental, e foi considerado como controle, o meio NBRIP líquido acrescido de fosfato de cálcio (5g/L) sem microrganismos.

A capacidade de cada estirpe para solubilizar o fósforo foi determinada pela diferença entre a quantidade de fósforo solúvel encontrada no meio de cultura com a bactéria inoculada e a quantidade presente no meio controle.

### 6.2.3 Influência da fonte de C na solubilização de fosfato

Para as análises seguintes, foram selecionadas as bactérias caracterizadas como mais eficientes para solubilização de fosfato, ou seja, as que apresentarem os maiores valores de IS em menor tempo.

As bactérias foram cultivadas em meio NBRIP +  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (que originalmente contem 10 g/L de glicose) com as seguintes modificações: 40 g/L de glicose (BATISTA et al., 2018) substituição da glicose por 10 g/L de manitol; substituição da glicose por 10 g/L de sacarose. Após 3, 7, 15 e 21 dias de incubação, avaliou-se a capacidade de solubilização de fosfato pelo índice de solubilização (IS), que consiste na razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro das colônias. O experimento foi realizado em triplicata.

### 6.2.4 Sequenciamento de genoma da estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSo 3281

O DNA total da estirpe selecionada CNPSo 3281 foi extraído usando o Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) seguindo instruções do fabricante. A preparação da biblioteca genômica foi feita com o Nextera Kit XT de acordo com as instruções do fabricante. O processamento da biblioteca genômica foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina) da Embrapa Soja, Londrina, Paraná. O esboço do genoma foi montado com o pipeline A5-MiSeq v.20140604. O tamanho do genoma estimado com RAST v.2.0 (Aziz et al. 2008) e confirmado com QUAST v.2.0 (Guerevich et al., 2013). As comparações ANI (*average nucleotide identity*) foram avaliadas com calculadora (disponível em <https://enveomics.ce.gatech.edu/ani/>). Para a estimativa de hibridização DNA-DNA foi usado um método bioinformática digital que permite comparações *in silico* de HDD (Meier-Kolthoff et al. 2013,2014). Todos os valores em pares com as espécies mais próximas foram estimados por GGDC v2.1 usando a Formula 2 recomendada ([https://ggdc.dsmz.de/distc\\_alc2.php](https://ggdc.dsmz.de/distc_alc2.php)). Para determinar o conteúdo G+C do DNA da estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSo 3281 foi usado QUAST (Guerevich et al., 2013). O genoma foi depositado na plataforma RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>).

### 6.2.5 Análise de genes relacionados a solubilização de fosfato em *Paraburkholderia* e filogenia das espécies solubilizadoras do gênero.

Foram analisados os genomas de espécies de *Paraburkholderia* que apresentaram relatos de solubilização de fosfato, *P. tuberum* LMG 21444<sup>T</sup>, *P.*

*silvatlantica* SRCL-318, *P. unamae* SCZa-39 (ANGUS et al., 2013.), *P. fungorum* LMG 16225<sup>T</sup> (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014), *P. kururiensis* LMG 19447<sup>T</sup> (ESTRADA et al., 2012), *P. phosphatilytica* 7QSK02<sup>T</sup> (GAO et al., 2019), *P. bryophila* LMG 23644<sup>T</sup>, *P. megapolitana* LMG 23650<sup>T</sup> (VANDAMME et al., 2007) e *P. tropica* Ppe8 (CASTRO-GONZALEZ et al., 2011). Vale ressaltar que foram escolhidos para busca genômica as estirpes tipo de cada espécie e não necessariamente a estirpe que os trabalhos relatavam como sendo solubilizadoras, com exceção para *P. unamae* e *P. silvatlantica* que os genomas das estirpes tipo não estavam disponíveis em bancos de dados.

Quanto a escolha de análise dos genomas de *P. nodosa* BR3437<sup>T</sup> e *P. guartelaensis* CNPSO 3008<sup>T</sup>, foi motivada pela alta similaridade genética com as estirpes de destaque neste estudo (*Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281; *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3076; *P. guartelaensis*. CNPSO 3003; *P. nodosa* CNPSO 3006 e *P. nodosa*. CNPSO 2998). Como a estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 possui classificação taxonômica ainda contraditória, podendo até mesmo representar uma nova espécie do gênero, seu genoma foi sequenciamento no presente estudo conforme descrito no item 5.7

A anotação foi feita na plataforma RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Para confirmação dos resultados encontrados foi feita verificação dos “enzyme comission number” (EC number) disponíveis na plataforma Expasy (<https://enzyme.expasy.org/>). Alguns genes são mostrados pelo RAST como hipotéticos, e por isso foi realizada nova busca pelas sequências no CDD (Conserved Domains Database) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) onde obtivemos mais informações sobre alguns domínios proteicos.

A busca foi focada em genes relacionados a solubilização de fosfato registrados na literatura para as estirpes estudadas neste trabalho e nas demais, a análise voltou-se para os genes *gcd*, codificador de glicose desidrogenase, *pqq*, codificador da pirroloquinolina quinona, *phoUBR*, um regulon para proteínas regulatórias da via de sinalização de P, *pstSCAB*, um regulon do complexo de transporte de fosfato, *ppk*, codificante da exopolifosfatase, *ppx*, que codifica a enzima polifosfato quinase, bem como a presença de fosfatases ácidas e alcalinas.

Para alinhamento dos genomas e construção da árvore filogenética do gene 16S DNAr, foi utilizado o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v. 6.1), o algoritmo de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura 3-parametros

(TAMURA, 1992) com distribuição de G+I (TAMURA et al. 2013). O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992).

#### 6.2.6 Análise estatística

Para as análises de solubilização em meio sólido, quantificação de solubilização de fosfato em meio líquido, pH do cultivo líquido, e influência da fonte de C na solubilização, foram utilizados dados em triplicatas e comparados usando a análise de variância Scott-Knott (5%) no programa SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2019).

Entre as análises de índice de solubilização de fosfato (halo/colônia) em meio sólido, quantificação de fosfato solubilizado em meio líquido e pH dos meios de cultura, foi feita uma correlação de Pearson, com o objetivo de indicar como as variáveis estão correlacionadas entre si no software R (v. 4.1.0).

### 6.3 RESULTADOS

#### 6.3.1 Avaliação da solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em meio sólido e influência da fonte de carbono

Após a análise em meio NBRIP sólido acrescido de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , foram selecionadas quinze estirpes (Tabela 3), que apresentaram formação de halos translúcidos ao redor de suas colônias. As estirpes selecionadas foram submetidas ao teste em meio NBRIP sólido acrescido de fosfato de Ca, Fe ou Al, este último em pH 4,5 e 7,0 (MARRA, et al. 2012).

Nenhuma das estirpes apresentou solubilização de fosfato de Fe, porém todas foram capazes de crescer no meio NBRIP +  $\text{FePO}_4$ . Com relação ao fosfato de Al, nenhuma bactéria produziu halos de solubilização e algumas estirpes não cresceram no meio, tanto em pH 4,5 quanto 7,0.

As bactérias foram avaliadas quanto ao IS, após 3, 7, 15 e 21 dias de incubação em meio NBRIP +  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Tabela 3). Aos 3 dias de incubação, as estirpes *P. nodosa* CNPSO 3006, *P. guartelaensis* CNPSO 3003, *P. nodosa* CNPSO 2998, *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3076 e *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 já apresentavam halos de solubilização, com os maiores IS atribuídos à estirpe *P. guartelaensis* CNPSO 3003 (Figura S1 Material Suplementar).

**Tabela 1:** Índices de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP sólido após três dias (IS 3D), sete dias (IS 7D), quinze dias (IS 15D) e vinte e um dias (IS 21D) de incubação. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas entre as estirpes em cada dia e as letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os períodos de incubação para uma mesma estirpe.

| Estirpe                                 | IS 3D                   | IS 7D                  | IS 15D                 | IS 21D                 |
|-----------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3509  | -                       | 1,80 ( $\pm$ 0,163) Ba | 2,4 ( $\pm$ 0,424) Ba  | 2,5 ( $\pm$ 0,432) Aa  |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3474  | -                       | -                      | 2,1 ( $\pm$ 0) Bb      | 2,73 ( $\pm$ 0,471) Aa |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3274  | -                       | -                      | 1,23 ( $\pm$ 0,047) Db | 1,6 ( $\pm$ 0) Ca      |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3247  | -                       | 1,96 ( $\pm$ 0,262) Ba | 2,0 ( $\pm$ 0,205) Ba  | 2,36 ( $\pm$ 0,094) Aa |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3076* | 1,60 ( $\pm$ 0) Bb      | 2,13 ( $\pm$ 0,124) Ab | 2,33 ( $\pm$ 0,205) Ba | 2,6 ( $\pm$ 0,141) Aa  |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3281* | 1,76 ( $\pm$ 0,0047) Bb | 2,16 ( $\pm$ 0,094) Ab | 2,8 ( $\pm$ 0,489) Aa  | 2,8 ( $\pm$ 0) Aa      |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 2998*            | 1,73 ( $\pm$ 0,0094) Bb | 1,83 ( $\pm$ 0,205) Bb | 2,8 ( $\pm$ 0,163) Aa  | 2,7 ( $\pm$ 0,094) Aa  |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3011             | 1,16 ( $\pm$ 0,124) Cb  | 1,50 ( $\pm$ 0) Cb     | 1,9 ( $\pm$ 0,141) Ca  | 1,96 ( $\pm$ 0,294) Ba |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3006*            | 1,13 ( $\pm$ 0,094) Cd  | 1,46 ( $\pm$ 0,170) Cc | 2,0 ( $\pm$ 0,047) Bb  | 2,43 ( $\pm$ 0,094) Aa |
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3003*     | 1,96 ( $\pm$ 0,04) Ab   | 2,13 ( $\pm$ 0,094) Ab | 2,6 ( $\pm$ 0,141) Aa  | 2,73 ( $\pm$ 0,262) Aa |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp CNPSO 3503     | 1,26 ( $\pm$ 0,205) Ca  | 1,40 ( $\pm$ 0,141) Ca | 1,4 ( $\pm$ 0,141) Da  | 1,53 ( $\pm$ 0,124) Ca |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 3504    | -                       | -                      | 1,33 ( $\pm$ 0,124) Da | 1,43( $\pm$ 0,262) Ca  |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp CNPSO 3512     | 1,30 ( $\pm$ 0,070) Cc  | 1,53 ( $\pm$ 0,094) Cb | 1,8 ( $\pm$ 0) Ca      | 1,86 ( $\pm$ 0,094) Ba |
| <i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3586         | -                       | 1,50 ( $\pm$ 0) Cb     | 1,53 ( $\pm$ 0,124) Db | 2,13 ( $\pm$ 0,047) Ba |
| <i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3476         | -                       | -                      | 1,7 ( $\pm$ 0,081) Cb  | 2,13 ( $\pm$ 0,047) Ba |

As cinco estirpes que apresentaram os maiores IS em menor tempo de incubação, foram *P. nodosa* CNPSO 2998, *P. nodosa* CNPSO 3006, *P. guartelaensis* CNPSO 3003, isoladas no Parque Estadual do Guartelá, de nódulos de *Mimosa gymnas*; *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 proveniente do mesmo Parque, porém isolada de *Mimosa paranapiacabae*; e *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3076 isolada de *Mimosa micropteris* nativa do Parque Estadual de Vila Velha.

Os alfa-rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium* sp CNPSO 3503, *Bradyrhizobium* sp. CNPSO 3504 e *Bradyrhizobium* sp CNPSO 3512) e *Rhizobium* (*Rhizobium* sp. CNPSO 3586 e *Rhizobium* sp. CNPSO 3476) mantiveram-se com os menores índices de solubilização em todos os dias de análise (Tabela 3). Tais estirpes foram isoladas de *Desmodium barbatum*, nativas do Parque Estadual do Cerrado e do Parque Nacional dos Campos Gerais.

Dentre as estirpes de *Paraburkholderia* analisadas, *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281, *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3076, *P. nodosa* CNPSO 2998 e *P. guartelaensis* CNPSO 3003 tiveram seu índice de solubilização estatisticamente estabilizado a partir de 15 dias, mesmo tendo uma maior solubilização. A estirpe *P. nodosa* CNPSO 3006 iniciou entre os menores IS em 3 e 7 dias, tendo um aumento significativo e constante, até o último período de avaliação figurando entre as maiores solubilizadoras. Já a estirpe *P. guartelaensis* CNPSO 3003, sempre figurou entre os maiores índices.

Vale ressaltar que a estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3474 mesmo apresentando uma solubilização tardia em relação às demais (15 dias de início do surgimento dos halos), manteve um crescimento em seu IS enquanto foi avaliada, similar às maiores solubilizadoras em 21 dias de avaliação.

Já a estirpe *P. nodosa* CNPSO 2998, apresentou um crescimento do tamanho da colônia, porém não do halo, o que levou a uma diminuição do índice de solubilização.

A alteração da quantidade de glicose no meio de cultivo NBRIP de 10 g (NAUTIYAL, 1999) para 40 g (DE ABREU, 2017), não influenciou positivamente a habilidade dessas estirpes em solubilizar o fosfato do meio, podendo até ser um reflexo negativo (Tabela 4). A exceção foi a estirpe *P. nodosa* CNPSO 3006 que em 3 dias apresentou maior IS com 40g de glicose.

Quanto à presença de outras fontes de carbono, *P. nodosa* CNPSO 3006 apresentou uma reduzida solubilização (IS= 1,26) em NBRIP acrescido de manitol, após 15 dias de incubação, o que pode ser relacionado com o seu desempenho na solubilização de fosfato de cálcio com 10g de glicose (Tabela 3). Com adição de sacarose em substituição à glicose, nenhuma das estirpes foi capaz de solubilizar fosfato (dados não apresentados).

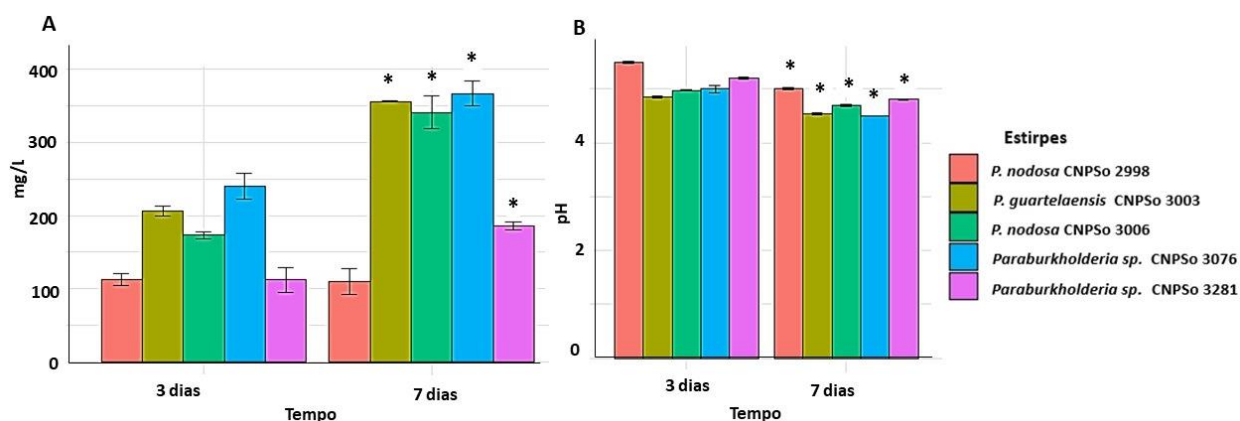
**Tabela 2:** Índices de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP sólido com diferentes fontes de carbono. 10 g/L de glicose (10g gli), 40 g/L de glicose (40g gli), e 10 g/L de manitol (man), após 3 dias (IS 3D), sete dias (IS 7D), quinze dias (IS 15D) e vinte e um dias (IS 21D) de incubação. \* representam diferença estatística entre os meios de cultura para cada estirpe em cada dia de análise.

| Estirpe                                | IS 3D 10g (gli)          | IS 3D 40g (gli)         | IS 7D 10g (gli)          | IS 7D 40g (gli)         | IS 15D (man)            | IS 15D 10g (gli)         | IS 15D 40g (gli)       | IS 21D (man)            | IS 21D 10g (gli)         | IS 21D 40g (gli)        |
|----------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>P. quartelaensis</i> CNPSO 3003     | 1,96<br>( $\pm 0,040$ )* | 1,3<br>( $\pm 0,081$ )  | 2,13<br>( $\pm 0,094$ )* | 1,73<br>( $\pm 0,047$ ) | -                       | 2,6<br>( $\pm 0,141$ )*  | 1,9<br>( $\pm 0,124$ ) | -                       | 2,73<br>( $\pm 0,262$ )* | 1,96<br>( $\pm 0,124$ ) |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3076 | 1,6<br>( $\pm 0$ )*      | -                       | 2,13<br>( $\pm 0,120$ )  | 1,6<br>( $\pm 0,294$ )  | -                       | 2,33<br>( $\pm 0,205$ )* | 1,8<br>( $\pm 0,094$ ) | -                       | 2,6<br>( $\pm 0,141$ )*  | 2<br>( $\pm 0,047$ )    |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3281 | 1,76<br>( $\pm 0,047$ )* | 1,1 ( $\pm 0$ )         | 2,16<br>( $\pm 0,094$ )  | 1,9<br>( $\pm 0,094$ )  | -                       | 2,8<br>( $\pm 0,489$ )*  | 2,1<br>( $\pm 0,047$ ) | -                       | 2,8<br>( $\pm 0$ )*      | 2,2<br>( $\pm 0,124$ )  |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 2998            | 1,73<br>( $\pm 0,094$ )* | -                       | 1,83<br>( $\pm 0,205$ )  | 1,4<br>( $\pm 0,094$ )  | -                       | 2,8<br>( $\pm 0,163$ )*  | 2,1<br>( $\pm 0,094$ ) | -                       | 2,7<br>( $\pm 0,094$ )*  | 2,2<br>( $\pm 0,094$ )  |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3006            | 1,13<br>( $\pm 0,094$ )  | 1,5<br>( $\pm 0,081$ )* | 1,46<br>( $\pm 0,170$ )  | 1,9<br>( $\pm 0,147$ )  | 1,26<br>( $\pm 0,094$ ) | 2<br>( $\pm 0,047$ )*    | 2<br>( $\pm 0,047$ )*  | 1,26<br>( $\pm 0,094$ ) | 2,43<br>( $\pm 0,094$ )* | 2<br>( $\pm 0,047$ )    |

### 6.3.2 Solubilização de $\text{CaPO}_4$ , $\text{AlPO}_4$ e $\text{FePO}_4$ em meio líquido e efeitos no pH do cultivo

As cinco estirpes com maiores IS em meio sólido tiveram sua habilidade quantificada em meio líquido (Figura 3). Apenas a estirpe *P. nodosa* CNPSO 2998 não apresentou diferença estatística na solubilização com mais tempo de incubação, tendo inclusive uma pequena redução na quantidade de fosfato solúvel disponível no meio. As demais demonstraram aumento estatístico na quantidade de fósforo solubilizado conforme o passar do tempo de incubação.

**Figura 3:** Gráfico representativo da (A) solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de cálcio e (B) valores de pH dos cultivos de cada estirpe em 3 e 7 dias de análise, o pH inicial dos cultivos era 7,0. Os \* representam diferença estatística.



As estirpes *P. quartelaensis* CNPSO 3003, *Paraburkholderia sp.* CNPSO 3076, *Paraburkholderia sp.* CNPSO 3281, *P. nodosa* CNPSO 2998 não tiveram diferença estatística na solubilização em placa entre 3 e 7 dias, aumentando significativamente com 15 dias, o que reforça a questão de que a solubilização é diferencial quando as estirpes estão em meio líquido, pois, as mesmas estirpes apresentaram aumento na solubilização em meio líquido de 3 para 7 dias. O comportamento da estirpe *Paraburkholderia sp.* CNPSO 3076 particularmente reforça esse ponto pois em meio sólido em 3 dias obteve o segundo melhor IS, já em meio líquido, foi mais eficiente solubilizadora no mesmo tempo, ultrapassando a *P. quartelaensis* CNPSO 3003, que se destacou em meio sólido.

Quanto aos níveis de acidificação do meio, todos apresentaram queda no pH inicial de 7,0, desde a primeira avaliação, e seguiram com diminuição progressiva, um indicativo da síntese e secreção de ácidos orgânicos pelas bactérias (Figura 3). Os dados detalhados estão apresentados na Tabela S6.

Por meio de uma análise estatística de correlação entre os resultados IS, a solubilização em meio líquido e os valores de pH foi constatado que apenas os dois últimos têm efetiva correlação negativa, quando a solubilização aumenta, o valor do pH diminui (Tabela 6). Os dados avaliados em meio sólido, não se correlacionam com as demais análises, demonstrando que o método não é o mais adequado para quantificação da capacidade solubilizadora de fosfato inorgânico de uma bactéria, apesar de ser o mais usado para a prospecção desse tipo de atividade promotora do crescimento de plantas.

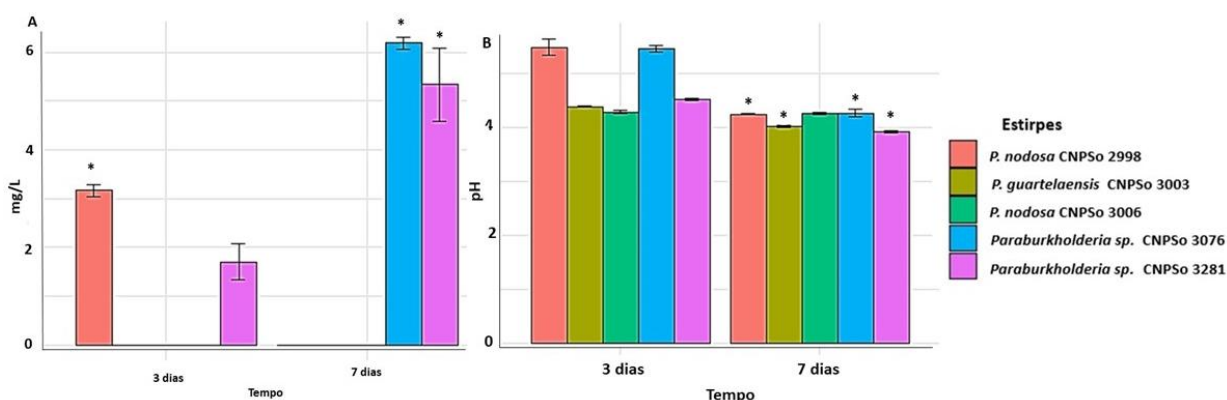
**Tabela 3:** Correlação de Pearson para os valores de pH, solubilização em meio líquido e IS em meio de cultivo NBRIP +  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $p < 0,05$ ). Software R. p-value adjustment method: Bonferroni. Observations: 30

| Parâmetro 1   | Parâmetro 2             | r     | 95% CI         | t (28) | p         |
|---------------|-------------------------|-------|----------------|--------|-----------|
| pH            | solubilização           | -0,86 | [-0,93, -0,72] | -8,91  | < .001*** |
| pH            | índice de solubilização | -0,3  | [-0,60, 0,07]  | -1,67  | 0,315     |
| solubilização | índice de solubilização | 0,13  | [-0,24, 0,47]  | 0,71   | > .999    |

Fonte: a autora.

Considerando a ausência de correlação entre IS e solubilização em meio líquido contendo fosfato de cálcio (Tabela 6), foi realizada a análise da solubilização de fosfato de ferro (Figura 4) e de alumínio (Figura 5). Dados detalhados em Tabela S7 e S8 Material suplementar.

**Figura 4:** Gráfico representativo da (A) solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de ferro e (B) valores de pH dos cultivos de cada estirpe em 3 e 7 dias de análise, o pH inicial dos cultivos era 7,0. Os \* representam diferença estatística.



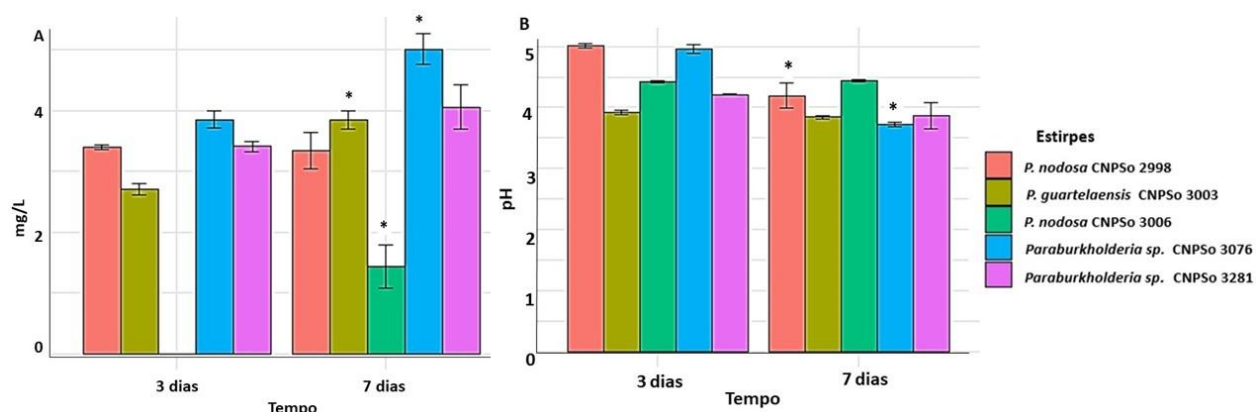
Fonte: a autora.

Nestas últimas análises, a estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3076 também apresentou melhor desempenho na solubilização que as demais, porém tendo uma solubilização tardia para fosfato de ferro, sendo identificada somente em 7 dias de análise. Com o fosfato de alumínio, observou-se solubilização desde os 3 dias de que

continuou durante o experimento, concluindo os 7 dias de análise com 4,49 mg/L de fosfato solúvel.

A estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 teve o segundo melhor desempenho na solubilização das três fontes de fosfato, e em relação a fosfato de ferro e fosfato de alumínio apresentou os maiores valores de acidificação do pH dos meios de cultivo (3,91 para fosfato de ferro e 3,86 para fosfato de alumínio). Para solubilização de fosfato de ferro, esta estirpe obteve resultado positivo já em 3 dias de análise e manteve um aumento da atividade solubilizadora até os 7 dias, já em meio NBRIP líquido acrescido de fosfato de alumínio, houve uma estabilidade na solubilização desde os 3 dias.

**Figura 5:** Gráfico representativo da (A) solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de fosfato de alumínio e (B) valores de pH dos cultivos de cada estirpe em 3 e 7 dias de análise, o pH inicial dos cultivos era 7,0. Os \* representam diferença estatística.



Fonte: a autora.

Quanto a estirpe *P. nodosa* CNPSO 2998, manteve o padrão já observado com fosfato de cálcio, onde ocorre solubilização em 3 dias de análise, porém o fosfato solúvel presente no meio em 7 dias é estatisticamente menor do que o inicial, chegando a 0 no caso do fosfato de ferro, mesmo mantendo a acidificação dos meios de cultivo até o final do experimento.

Em geral, as cinco estirpes selecionadas para avaliação em meio NBRIP líquido acrescido de três fontes de fosfato distintas apresentaram uma melhor solubilização de fosfato de cálcio, seguido por fosfato de alumínio e por fim, fosfato de ferro. Na presença de todas as fontes de fosfato houve acidificação do meio de cultivo em relação ao pH inicial de 7,0, com pH final de 3,91 a 4,26 (fosfato de ferro) e 3,84 a 4,44 (fosfato de alumínio).

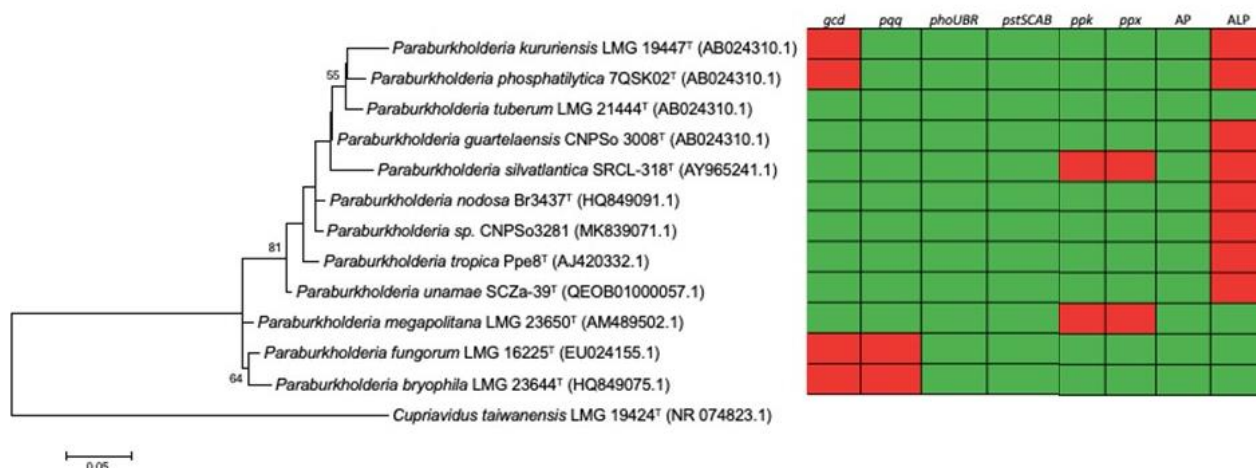
### 6.3.3 Sequenciamento de genoma, anotação de genes relacionados a solubilização de fosfato em *Paraburkholderia* spp. e filogenia de espécies solubilizadoras do gênero.

Estando entre as estirpes de maior solubilização de fosfato, o genoma da estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSo 3281 foi sequenciado e encontra-se disponível no servidor RAST sob a identificação de 6666666.798865 - *Paraburkholderia* sp. CNPSo 3281; trabalho número #1050252. O tamanho do genoma é de 8.799.142 pb e seu conteúdo GC é de 64.1; número de contigs é de 208, contendo 8768 sequencias codificadoras e 83 RNAs.

Utilizando a plataforma RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), foram feitas buscas nos genomas de doze estirpes do gênero *Paraburkholderia* que apresentaram solubilização de fosfato segundo a literatura (Figura 4), *P. tuberum* LMG 21444<sup>T</sup>, *P. silvatlantica* SRCL-318, *P. unamae* SCZa-39 (ANGUS et al., 2013.), *P. fungorum* LMG 16225<sup>T</sup> (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014), *P. kururiensis* LMG 19447<sup>T</sup> (ESTRADA et al., 2012), *P. phosphatilytica* 7QSK02<sup>T</sup> (GAO et al., 2019), *P. bryophila* LMG 23644<sup>T</sup>, *P. megapolitana* LMG 23650<sup>T</sup> (VANDAMME et al., 2007) e *P. tropica* Ppe8 (CASTRO-GONZALEZ et al., 2011), incluindo as 3 espécies de melhores resultados investigadas neste trabalho (*P. nodosa*; *P. guartelaensis*; *Paraburkholderia* sp. CNPSo 3281).

Observa-se uma relação entre filogenia e presença/ausência de genes relacionados à solubilização de fosfato. Todos os genes que foram avaliados estão presentes na estirpe *P. tuberum* LMG 21444<sup>T</sup>. Os genes *gcd* e codificadores de fosfatase alcalina não foram identificados nas espécies solubilizadoras mais próximas de *P. tuberum* LMG 21444<sup>T</sup>, *P. kururiensis* LMG 19447<sup>T</sup>, *P. phosphatilytica* 7QSK02<sup>T</sup>. Genes que codificam fosfatases ácidas foram identificados em todos os genomas analisados enquanto a distribuição de genes responsivos pelas fosfatases alcalinas foram mais restritos (Figura 4).

**Figura 6:** Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA de espécies solubilizadoras de fosfato do gênero *Paraburkholderia*, utilizando o software Mega 6.06 (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura 3-parametros, suporte de *bootstrap* baseado em 1000 repetições). A tabela apresenta a presença (verde) ou ausência (vermelho) de genes relacionados a vias de solubilização de fosfato, identificados utilizando ferramenta disponíveis no RAST. (AP): fosfatase ácida; (ALP): fosfatase alcalina; (gcd) glicose desidrogenase; (pqq) pirroloquinolina quinona, (phoUBR) sistema de sinalização de fosfato; (pstSCAB) complexo de transporte de fosfato, (ppk) polifosfato quinase e (ppx) exopolifosfatase.



Foi observada uma conservação na disposição em que se encontram, os genes *phoUBR*, *pstSCAB*, *ppxi* e *ppk* nas estirpes *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281, *P. nodosa* BR3437 e *P. quartelaensis* CNPSO 3008<sup>T</sup>. Os genes *gcd* e *pqq* não apresentaram conservação quanto à localização nos genomas analisados (Figura 2 do material suplementar).

Outros genes relacionados ao metabolismo do fosfato também foram identificados nos genomas das estirpes estudadas, como os *phnCDE*, relativos a proteínas transportadoras de fosfonatos; para a síntese de ácidos orgânicos encontramos gluconolactonase (*gnl*) para ácido glucônico; isocitrato sintase (*gltA*) e malato desidrogenase (*mdh1*) para ácido glicólico; piruvato desidrogenase (*poxB*) e aldeído desidrogenase (*aldB*) para ácido acético; e glicoxilato redutase (*gyaR*) para ácido glicólico (Tabelas S2, S3 e S4, Material suplementar). É notório que há uma alta conservação na presença e localização desses genes nas estirpes *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281, *P. nodosa* BR3437 e *P. quartelaensis* CNPSO 3008<sup>T</sup>.

A análise preliminar da produção de ácidos orgânicos pelas estirpes que foram avaliadas quantitativamente em meio líquido, mostrou a presença de ácido glucônico, o que é compatível com a presença de genes correspondentes a enzimas envolvidas na produção do mesmo (dados não apresentados).

## 6.4 DISCUSSÃO

Análises filogenéticas de rizóbios isolados de nódulos de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná já apontavam a ocorrência de uma ampla diversidade de bactérias dos gêneros *Paraburkholderia* e, em menor quantidade, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, inclusive com a ocorrência de novos táxons (PAULISTCH et al., 2019a; PAULISTCH et al., 2019b; KLEPA et al., 2021; PROTACHEVICZ et al., submetido). Os autores atribuíram tal diversidade ao fato das plantas hospedeiras serem nativas/endêmicas, com ocorrência em ecossistemas naturais que apresentam zonas de transição entre os Biomas Mata Atlântica e Cerrado, um ecótono, com biodiversidade diferenciada em relação aos dois Biomas adjacentes, dentre outros fatores (CARMO, 2006; RITTER, 2010).

Ao avaliar as habilidades fisiológicas desses rizóbios, HAINOSZ (2020) constatou sua diferencial capacidade de crescimento em pH ácido, diferentemente de relatos prévios de que rizóbios têm baixa tolerância a pHs inferiores a 5 (HUNGRIA ; VARGAS, 2000; HELLWEG et al., 2009; TULLIO et al., 2019). De fato, os solos das áreas de amostragem desses rizóbios são ácidos (pH entre 5,5 e 3,6) e majoritariamente arenosos (Tabela S1, Material suplementar). Muleta e colaboradores (2021) sugerem que solos ácidos podem abrigar um maior número de determinados tipos de rizóbios solubilizadores de fosfato.

A acidificação do meio por extrusão de prótons e/ou produção de ácidos orgânicos é o principal mecanismo para solubilização de fosfatos (YADAV, et al. 2015; KOUR et al., 2020). Assim como outros trabalhos demonstraram (GULATI et al., 2008; FERNANDEZ, et al. 2012; ESTRADA, et al. 2012; GAO, et al. 2019;), o crescimento das estirpes avaliadas nesse estudo causou acidificação do meio líquido de pH inicial 7,0 para valores entre 5 e 4,9 já em três dias de incubação, e que se manteve diminuindo até o final do experimento (pH 5 a 4,5).

A redução dos valores de pH foram correlacionadas negativamente com a quantidade de fosfato solúvel nas amostras de cultivo líquido, onde quanto maior a quantidade de fosfato solubilizado menor era o valor do pH, assim como relatado por De Abreu, et al. (2017) e Silva et al. (2021) para outros gêneros de bactérias solubilizadoras. Não verificou-se correlação entre pH ou solubilização em meio NBRIP líquido com os IS em meio NBRIP sólido, o que pode demonstrar uma restrição da metodologia em placas em classificar as estirpes quanto ao seu potencial solubilizador

(NAUTIYALL, 1999; MARRA et al., 2012). Inclusive a estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3076 teve um desempenho melhor em relação as demais testadas em meio NBRIP líquido, do que em NBRIP sólido. Em meio líquido há uma maior difusão dos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias do que em placas com ágar (MARRA et al., 2012).

Com o acréscimo de 40 g/L de glicose na formulação do NBRIP sólido, conforme indicação de ABREU et al, 2017 ou a substituição de 10 g/L de glicose por outras fontes de carbono (sacarose e manitol), as estirpes que apresentaram os maiores IS na formulação original de NBRIP, tiveram seu desempenho consideravelmente prejudicado. Segundo Silva Filho ; Vidor (2000) a fonte de carbono influencia diretamente na solubilização, principalmente o tamanho das moléculas de carboidratos utilizadas.

Considerando as diferenças estruturais entre as moléculas de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ), manitol ( $C_6H_{14}O_6$ ) e sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) e que alguns mecanismos descritos para solubilização de fosfato estão intimamente ligados às vias metabólicas de carbono (GOLDSTEIN, 1995; SILVA et al., 2021) essas substituições são relevantes para entender melhor as possibilidades metabólicas das bactérias de interesse. A única estirpe testada capaz de utilizar manitol para solubilização de fosfato de cálcio foi *P. nodosa* CNPSO 3006, um indicativo de uma funcionalidade diferenciada em relação às demais representantes do gênero estudadas. Essas mudanças só foram testadas para estirpes de *Paraburkholderia* de maior destaque nos testes iniciais do estudo, não se pode concluir que o mesmo aconteceria para outros gêneros expostos às mesmas condições.

Nenhuma estirpe investigada neste estudo apresentou habilidade de solubilização de fosfatos de ferro ou alumínio em meio NBRIP sólido, como já relatado anteriormente em outros estudos (SILVA FILHO et al., 2001; LIN et al., 2006; SONG et al., 2008; MARRA et al., 2012). Ao testar a solubilização de fosfato de alumínio em diferentes valores de pH (4,5 e 7,0) em meio sólido, pudemos constatar que um pH inicial ácido não influenciou na solubilização (dados não apresentados).

Devido a falta de correlação observada entre solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido (IS) e líquido, considerou-se necessária a avaliação de solubilização de fosfato de ferro e alumínio também em meio líquido, onde identificou-se uma resposta diferenciada também.

A quantidade destes fosfatos solubilizados é consideravelmente inferior aos níveis de fosfato de cálcio no mesmo teste, assim como relatos de outros autores (SILVA ; VIDOR, 2001; MARRA et al., 2012; MARRA et al., 2019; SILVA et al., 2021, MULETA et al., 2021). Bashan e colaboradores (2013) esclareceram que a menor solubilidade dos fosfatos de ferro e de alumínio em água, poderia prejudicar a avaliação de um microrganismo quanto a sua atividade solubilizadora.

Durante a solubilização de fosfato de cálcio, de ferro e de alumínio em meio líquido, a estirpe *P. nodosa* CNPSo 2998 apresentou redução no fosfato solubilizado após 7 dias de experimentação, comportamento que também já foi observado em outras estirpes por Batista e colaboradores (2018). Essa diminuição pode ser relativa ao uso do fosfato solubilizado pela própria estirpe para seus processos anabólicos (MENDES ; JUNIOR, 2003; ZHANG et al., 2018), fato que já foi observado em solubilizadores de fosfato por Guang-Can e colaboradores (2008). Somando-se a isso, Zeng et al. (2017) e Liu et al. (2020) ainda mostraram que quanto mais fosfato solúvel exógeno estiver presente no meio, menos a bactéria irá solubilizar.

Dentre os rizóbios analisados, o gênero *Paraburkholderia* se mostrou mais eficiente em solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido, do que os alfa-rizóbios dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Apesar de alguns trabalhos já terem apontado tal habilidade dentre os alfa-rizóbios, eles usualmente não apresentam IS elevados (SRIDEV et al., 2009; KAUR et al., 2016; HSU et al., 2018; LIANG et al., 2020; SANTOS-TORRES et al., 2021) provavelmente por sua limitada tolerância a pHs ácidos.

A grande versatilidade metabólica do gênero *Paraburkholderia* (BERNABEU et al., 2018; LEE ; JEON et al., 2019), com variado repertório de atividades biológicas que inclui a solubilização de fosfato (GAO et al., 2019), pode ser atribuída ao tamanho de seus genomas e sequencias de inserção que promovem alta adaptabilidade (O'SULIVAN ; MAHENTHIRALINGAM, 2005; VIO et al., 2020).

Espécies do gênero *Paraburkholderia* já foram descritas como solubilizadoras de fosfato de cálcio, como *P. tuberum*, *P. silvatlantica*, (ANGUS et al., 2013.), *P. kururiensis* (ESTRADA et al., 2012), *P. phosphatilytica* (GAO et al., 2019), *P. unamae* e *P. tropica*, que também produzem sideróforos mas não foram testadas em fosfato de ferro (CASTRO-GONZALEZ et al., 2011) e também fosfato de alumínio, como *P. fungorum* (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014), e com atividade de fosfatases ácidas e alcalinas, como é o caso de *P. bryophila*, *P. megapolitana* (VANDAMME et al., 2007).

Algumas espécies solubilizadoras de *Paraburkholderia* foram originalmente isoladas de solos com pH ácidos, como *P. megapolitana*, *P. bryophila*, e *P. unamae*, (VANDAMME et al., 2007; CABALLERO-MELLADO et al., 2014). Apesar do relato da eficiência em solubilizar fosfatos de estirpes de *Paraburkholderia* diazotróficas associativas (CASTRO-GONZALEZ et al., 2011; ESTRADA et al., 2012; ANGUS et al., 2013; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014), o mesmo não se observa quanto aos rizóbios do gênero.

Foram analisados os genomas das espécies solubilizadoras mencionadas anteriormente, com enfoque maior para *P. nodosa* BR3437<sup>T</sup>; *P. guartelaensis* CNPSO 3008<sup>T</sup> e *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281, que tem maior similaridade genética com as cinco estirpes de melhor resultado para solubilização de fosfato de cálcio identificadas neste estudo (Figura 3).

Identificamos a presença de genes para fosfatases ácidas em todas as estirpes analisadas, porém para as fosfatases alcalinas a ocorrência foi mais restrita. Devido à grande importância dessas enzimas na mineralização de fosfatos orgânicos, onde realizam hidrólise de compostos orgânicos liberando fosfato (FRASER et al., 2016; PRABHU; BORKAR; GARG, 2019) e considerando que a anotação de fosfatases alcalinas foi restrita devido aos dados disponíveis na plataforma *RAST*, serão realizadas análises para detecção da atividade destas enzimas nas estirpes selecionadas.

A produção das fosfatases está atrelada a sistemas de identificação e sinalização de fosfato, onde a célula passa a expressar as enzimas de acordo com a baixa disponibilidade de fosfato no ambiente em que está inserida. Este é o caso dos complexos regulatórios codificados pelos regulons *phoUBR* e *pstSCAB* (NAKATA et al., 1984; RODRIGUEZ et al., 1999; GEIGER et al., 1999; LIDBURY et al., 2016; IYER ; RAJKUMAR, 2019; LIANG et al., 2020; YOU et al., 2020). As proteínas regulatórias PhoR fosforilam o regulador transcricional codificado pelo gene *phoB* quando há pouco fosfato disponível, o que leva a expressão de outros genes relacionados ao transporte de fosfato. Já quando existem altas concentrações de fosfato no meio, a proteína PhoU age como um regulador negativo do sistema de transporte específico de fosfato *pstSCAB*. Como o complexo *pstSCAB* atua na fosforilação de compostos que entram no periplasma da célula em condição de baixa presença de fosfato assimilável, se a célula não tem necessidade de adquirir mais fosfato no momento, PhoU impede que a fosforilação desses compostos continue acontecendo (CHANT et

al., 1995; BRAIBANT et al., 1996; SHIRPISRE et al., 1998; YUAN et al., 2006; LIDBURY et al., 2016; VUPPADA et al., 2018; YOU et al., 2020; LIU et al., 2020).

Em relação aos ácidos orgânicos, estes são considerados produtos metabólicos ou intermediários da via metabólica de carbono da célula (SILVA, et al. 2021). Análises preliminares da presença desses ácidos nos cultivos líquidos indicam presença de ácido glucônico, assim como em outras estirpes solubilizadoras descritas na literatura (MARRA et al., 2012; YADAV et al., 2015; DE ABREU et al., 2017; IYER ; RAJKUMAR et al., 2019; ALAYAR et al., 2020; SANTOS-TORRES et al., 2021). Como o ácido glucônico pode ser um produto das enzimas glicose desidrogenase dependente de pirroquinolina (*gcd*, *pqq*) e gluconolactonase (*gnl*), e ambos os genes foram encontrados nos genomas anotados, não se pode afirmar qual delas está sendo expressa.

Ainda que as estirpes em questão possuam genes para produção de ácido glioxílico (*aceA*, *gltA*, *glcB*, *mdh1*), acético (*poxB*; *aldB*) e glicólico (*gyaR*) (Tabelas S2 a S4 Material suplementar), estes não foram identificados nos sobrenadantes das culturas.

Nas estirpes mais próximas filogeneticamente, está mais evidente a afinidade na ausência e presença dos genes avaliados, como é o caso de *P. kururiensis* LMG 19447<sup>T</sup> e *P. phosphatilytica* 7QSK02<sup>T</sup>, que não apresentam o gene *gcd*, mas possuem o gene de seu co-fator PQQ; e também para *P. fungorum* LMG 16225<sup>T</sup> e *P. bryophila*, LMG 23644<sup>T</sup> em que ambas não apresentam os genes *gcd* e *pqq*.

A presença dos genes *ppk* e *ppx* remetem à capacidade dessas bactérias de acumular polifosfato e o utilizar como fonte de fosfato quando necessário. Ainda, os grânulos de polifosfato, podem ser liberados durante lise celular enriquecendo o ambiente com compostos fosfatados para utilização por outros seres vivos (ZAGO et al., 1999; MULLAN et al., 2002; CARDONA et al., 2002; PRABHU, BORKAR; GARG, 2019).

As bactérias solubilizadoras de fosfato tem o potencial de se estabelecer como recurso biotecnológico para agroecossistemas (KOUR, et al. 2020) ou na recuperação de ambientes degradados. Avaliando-se solos degradados em processo de regeneração, nas regiões com mais biodisponibilidade de fósforo havia também uma presença maior de genes microbianos relacionados a ciclagem do fósforo, entre eles o *gcd*, que é considerado o gene de maior relevância dentre os mecanismos de solubilização de fosfato (Liang et al., 2020, ALAYAR et al., 2019, 2020).

## 7 CONCLUSÃO

A já reconhecida diversidade genética de rizóbios do gênero *Paraburkholderia* presente nos solos dos Campos Gerais do Paraná, abriga habilidades essenciais para promoção do crescimento vegetal, como solubilização de fosfatos de cálcio, ferro e alumínio. Somadas ao fato de serem fixadoras de nitrogênio, possuem potencial contribuição para a adaptabilidade de espécies hospedeiras e sustentabilidade dos ecossistemas aos quais pertencem.

Diferente de vários relatos prévios, verificamos que rizóbios podem ser eficientes solubilizadores de fosfato, salientando-se a necessidade de estudos *in vivo*. Além disso, sugere-se a adoção de outras estratégias de triagem em substituição ou complementação à clássica avaliação dos IS em meio sólido.

## REFERÊNCIAS

- ANGUS, A. A. et al. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. **Plant and Soil**, v. 369, n. 1, p. 543-562, 2013.
- ANGUS, A. A. et al. Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, p. e83779, 2014.
- ALAYLAR, B. et al. Rapid detection of fosfato-solubilizing bacteria from agricultural areas in Erzurum. **Current microbiology**, v. 76, n. 7, p. 804-809, 2019.
- APEL, A. K. et al. Fosfato control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3527-3537, 2007.
- BATISTA, F. de C. et al. Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos. **Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2018.
- BALDER R, et al. (2010) Identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* adhesins for human respiratory epithelial cells. **BMC Microbiol** v.10, p. 20–25.
- BERNABEU, P. R. et al. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 113-120, 2015.
- BONTEMPS, C. et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular ecology**. v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010.
- BRAIBANT, M. et al. A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of a fosfato transportador homologous to the *Escherichia coli* Pst system. **Gene**, v. 176, n. 1-2, p. 171-176, 1996.
- CASTRO-GONZÁLEZ, R. et al. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and soil**, v. 345, n. 1, p. 155-169, 2011.
- CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J. Inoculation with selected microbial consortia not only enhances growth and yield of French bean but also reduces fertilizer application under field condition. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 441–446, 2015.
- CHAN, F.; TORRIANI, A.. PstB protein of the fosfato-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 13, p. 3974-3977, 1996.
- CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1165-1172, 2004.
- CARDONA, S. T.; CHÁVEZ, F. P.; JEREZ, C. A. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in

polyfosfato metabolism in archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4812-4819, 2002.

CARMO, M. R. B. Caracterização fitofisionômica do Parque Estadual do Guartelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - UNESP, Rio Claro, 2006

COMPANT, S., NOWAK, J., COENYE, T., CLÉMENT, C., BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 607-626, 2008.

COSGROVE, D. J. Microbial Transformations in the Phosphorus Cycle. **Advances in Microbial Ecology**. p. 95–134. 1977

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.22 (2), p.107-149, 2003.

DOBRITSA, A. P.; SAMADPOUR, S; 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*. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 66, p. 2836-2846, 2016.

DOS REIS JUNIOR F.B, et al. (2010) Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytol** 186:934–946.

DUMORA, C. et al. First characterization of the phosphonoacetAcetiltransferase hydrolase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene**, v. 197, n. 1-2, p. 405-412, 1997.

ESTRADA, G. A. et al. Selection of fosfato-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and soil**, v. 369, n. 1, p. 115-129, 2013.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. et al. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. **Current microbiology**, v. 67, n. 1, p. 51-60, 2013.

FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS. **Revista brasileira de biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Available at: <<http://www.biometria.ufra.br/index.php/BBJ/article/view/450>>.

FERNÁNDEZ, L. et al. *Pseudomonas* spp. isolates with high fosfato-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. **Biology and fertility of soils**, v. 48, n. 7, p. 763-773, 2012.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FRASER, T. D. et al. Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. **Applied Soil Ecology**, v. 111, p. 48-56, 2017.

GAO, Z. et al. Paraburkholderia phosphatilytica sp. nov., a fosfato-solubilizing bacterium isolated from forest soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 69, n. 1, p. 196-202, 2019.

GEIGER, O. et al. The regulator gene phoB mediates fosfato stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-N, N, N-trimethylhomoserine in Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti. **Molecular microbiology**, v. 32, n. 1, p. 63-73, 1999.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can J Microbiology**, v.41, p.109–117, 1995.

GOLDSTEIN, A. H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium fosfato solubilization by gram negative bacteria. **Biological Agriculture ; Horticulture**, v. 12, n. 2, p. 185-193, 1995.

GUANG-CAN, T. A. O. et al. Phosphate-solubilizing and-mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. **Pedosphere**, v. 18, n. 4, p. 515-523, 2008.

GULATI, A; RAHI, P; VYAS, P. Characterization of fosfato-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. **Current microbiology**, v. 56, n. 1, p. 73-79, 2008.

HAINOSZ, J. Caracterização de rizóbios nativos dos campos gerais quanto à atividades promotoras do crescimento vegetal e tolerância a estresses abióticos. 2020. p. 76. **Dissertação de Mestrado (Biologia Evolutiva)** - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, 2020

HARDOIM, P.R., VAN OVERBEEK, L.S., BERG, G., PIRTTILÄ, A.M., COMPANT, S., CAMPISANO, A., DÖRING, M., AND SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 79:293-320, 2015.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann Microbiol** 60(4):579–598. doi:10.1007/s13213-010-0117-1, 2010.

HEDGES, S. B.. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 366-369, 1992.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N-2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crop Res.** 65:151-164, 2000.

HELLWEG, C.; PÜHLER, A.; WEIDNER S. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. **BMC Microbiol** 9:37–53. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-37>, 2009.

IYER, B; RAJKUMAR, S.. Succinate irrepressible periplasmic glucose desidrogenase of Rhizobium sp. Td3 and SN1 contributes to its fosfato solubilization ability. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 5, p. 649-659, 2019.

JI, S. H.; LEE, C. H.; KIM, J. S.; SEO, H. S.; CHUN, S. C.; OH, J.; CHOI, E. H.; PARK, G. Enhancement of vitality and activity of a plant growth-promoting bacteria (BPCP) by

atmospheric pressure non-thermal plasma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.

KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; GANESHAMURTHY, A. N. Draft genome sequence of fosfato-solubilizing bacterium *Paraburkholderia tropica* strain P-31 isolated from pomegranate (*Punica granatum*) rhizosphere. **Genome Announc.**, v. 4, n. 4, p. e00844-16, 2016.

KLEPA, Milena Serenato et al. Molecular diversity of rhizobia-nodulating native Mimosa of Brazilian protected areas. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 9, p. 5533-5545, 2021.

KOUR, D. et al. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and-mobilizing microbes: A review. **Pedosphere**, v. 31, n. 1, p. 43-75, 2021.

LAPPALAINEN, H. K. et al. Pan-Eurasian Experiment (PEEX): Towards holistic understanding of the feedbacks and interactions in the land-atmosphere-ocean-society continuum in the Northern Eurasian region. **Atmospheric Chemistry and Physics Discussions**, v. 16, p. 14421-14461, 2016.

LEE, Y; LEE, Y; JEON, C. O. Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

LIANG, J. et al. Novel fosfato-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. **The ISME journal**, v. 14, n. 6, p. 1600-1613, 2020.

LIU, Y. et al. Identification, cloning and expression patterns of the genes related to fosfato solubilization in *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different soluble fosfato levels. **AMB Express**, v. 10, p. 1-11, 2020.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and fosfato solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, n.1-2, p. 289-307, 2012.

MCGRATH J. W. et al. The purification and properties of phosphonoacetate hydrolase, a novel carbon-phosphorus bond-cleaving enzyme from *Pseudomonas fluorescens* 23F. **European Journal of Biochemistry**. V. 234, p. 225-230. 1995.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MENDES, I. C; DOS REIS JÚNIOR, F. B. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. **Embrapa Cerrados**. p. 26 ISSN 1517-5111; 85. 2003

MOULIN, L.; JAMES, E. K.; KLONOWSKA, A.; FARIA, S. M.; SIMON, M. F. Phylogeny, Diversity, Geographical Distribution, and Host Range of Legume-Nodulating Betaproteobacteria: What Is the Role of Plant Taxonomy? **Biological nitrogen fixation**, John Wiley ; Sons, Hoboken, p. 177-190, 2015.

MULLAN, A; QUINN, J. P.; MCGRATH, J. W. A nonradioactive method for the assay of polyfosfato kinase activity and its application in the study of polyfosfato metabolism in *Burkholderia cepacia*. **Analytical biochemistry**, v. 308, n. 2, p. 294-299, 2002.

MULETA, Atsede et al. Phosphate solubilization and multiple plant growth promoting properties of *Mesorhizobium* species nodulating chickpea from acidic soils of Ethiopia. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 5, p. 2129-2137, 2021.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening fosfato solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NAKATA, A; AMEMURA, M; SHINAGAWA, H. Regulation of the fosfato regulon in *Escherichia coli* K-12: regulation of the negative regulatory gene *phoU* and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 159, n. 3, p. 979-985, 1984.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1239-1250, 2014.

OTEINO, N. A. et al. Plant growth promotion induced by fosfato solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, N. 745, 2015.

O'SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E.. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in applied microbiology**, v. 41, n. 1, p. 8-11, 2005.

PAULITSCH, F. et al. Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating native *Mimosa gymnas* grown in a South Brazilian ecotone. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p.529-540, 2019<sup>a</sup>.

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. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 10, p. 1435-1446, 2019<sup>b</sup>.

PAULITSCH, F. et al. *Paraburkholderia atlantica* sp. nov. and *Paraburkholderia franconis* sp. nov., two new nitrogen-fixing nodulating species isolated from Atlantic forest soils in Brazil. **Archives of Microbiology**, p. 1-12, 2020.

PAULITSCH, F; DOS REIS, F. B; HUNGRIA, M. Twenty years of paradigm-breaking studies of taxonomy and symbiotic nitrogen fixation by beta-rhizobia, and indication of Brazil as a hotspot of *Paraburkholderia* diversity. **Archives of Microbiology**, p. 1-19, 2021.

PRABHU, N; BORKAR, S; GARG, S. Fosfato solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. In: **Advances in Biological Science Research**. Academic Press, 2019. p. 161-176.

PROTACHEVICZ, A. P. et al; Diversidade e filogenia molecular de rizóbios associados a *Desmodium* spp. nativa dos Campos Gerais do Paraná. **Molecular Biology Reports**. 2021.

RAAIJMAKERS, J.M.; TIMOTHY C.; PAULITZ, C. T.; STEINBERG C.; ALABOUVETTE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant Soil**, v.321, p.341-361. 2009.

RAWAT, P. et al. Fosfato-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in fosfato solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49-68, 2021.

RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; MORO, R. S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil-limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 379-414, 2010

RODRÍGUEZ, H. et al. Genetics of fosfato solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and soil**, v. 287, n. 1, p. 15-21, 2006.

ROSSOLINI, G. M. et al. Bacterial nonspecific acid phosphatases: physiology, evolution, and use as tools in microbial biotechnology. **Cellular and Molecular Life Sciences**. V. 54. P. 833-850. 1998.

RODRÍGUEZ, H; FRAGA, R. Fosfato solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

RUTTENBERG, K. C. Treatise on Geochemistry. **Elsevier**. V. 8. p.585-643. 2003.

SANTOS-TORRES, M. et al. Genomic and phenotypic analysis of rock fosfato-solubilizing rhizobacteria. **Rhizosphere**, v. 17, p. 100290, 2021.

SAWANA, A; ADEOLU, M; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 429, 2014.

SIMON, M. F., GREETHER, R., DE QUEIROZ, L. P., SÄRKINEN, T. E., DUTRA, V. F., ; HUGHES, C. E. The evolutionary history of Mimosa (Leguminosae): toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. 1201-1221, 2011.

SILVA FILHO, G. N; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000.

SILVA FILHO, G. N; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1495-1508, 2001.

SILVA, U. C. et al. Genomic and phenotypic insights into the potential of rock fosfato solubilizing bacteria to promote millet growth in vivo. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 2020

SHROPSHIRE, H. et al. Proteomics insights into the Burkholderia cenocepacia phosphorus stress response. **Environmental Microbiology**, 2021.

SMITH, S.E; READ, D. Mycorrhizal Symbiosis. Capítulo 10. P. 349-386. 3ª ed. **Academic Press** – Elsevier. New York, USA, 2008.

SONG, O. et al. Solubilization of insoluble inorganic fosfato by Burkholderia cepacia DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 151-156, 2008.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V. Fosfato solubilization by Rhizobium strains. **Indian journal of microbiology**, v. 49, n. 1, p. 98-102, 2009.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 4, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., ; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725- 2729, 2013

TAULÉ C, et al. (2012) New betaproteobacterial Rhizobium strains able to efficiently nodulate Parapiptadenia rígida (Benth.) Brenan. **Appl Environ Microbiol** 78:1692–1700.

TULLIO, Leandro Datola et al. Proteomic analysis of Rhizobium freirei PRF 81T reveals the key role of central metabolic pathways in acid tolerance. **Applied Soil Ecology**, v. 135, p. 98-103, 2019.

VANDAMME, P; COENYE, T. Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.

VANDAMME, P. et al. Burkholderia bryophila sp. nov. and Burkholderia megapolitana sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2228-2235, 2007.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970.

VUPPADA, R. K. et al. Fosfato signaling through alternate conformations of the PstSCAB fosfato transportador. **BMC microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2018.

VIO, S. A. et al. Paraburkholderia. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 271-311.

WAGG, C.; JANSÁ J.; STADLER M.; SCHMID B.; VAN DER HEIJDEN M. G. A. Mycorrhizal fungal identity and diversity relaxes plant-plant competition. **Ecology**, v. 92, n. 6, p. 1303–1313, 2011.

WANG, F.; WANG, E.T.; WU, L.J.; SUI, X.H.; LI, Y. JR; CHEN, W.X.- *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. International. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 6, n. 11, p. 2582–2588, 2011.

YADAV, A. N. et al. Haloarchaea endowed with phosphorus solubilization attribute implicated in phosphorus cycle. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

YOU, M. et al. Isolation and characterization of Burkholderia cenocepacia CR318, a fosfato solubilizing bacterium promoting corn growth. **Microbiological research**, v. 233, p. 126395, 2020.

YUAN, Z; ZAHEER, R; FINAN, T. M. Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity fosfato transport system of Sinorhizobium meliloti. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1089-1102, 2006.

ZAGO, A; CHUGANI, S; CHAKRABARTY, A. M. Cloning and characterization of polyfosfato kinase and exopolyphosphatase genes from Pseudomonas aeruginosa 8830. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2065-2071, 1999.

ZENG, Q. et al. Fosfato solubilization and gene expression of fosfato-solubilizing bacterium Burkholderia multivorans WS-FJ9 under different levels of soluble fosfato. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 844-855, 2017.

ZHANG, Lin et al. Closing the loop on phosphorus loss from intensive agricultural soil: a microbial immobilization solution?. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 104, 2018.

## **APÊNDICE A: MATERIAL SUPLEMENTAR**

**Tabela S1:** Parâmetros físico-químicos dos solos. Os solos dos pontos VV1, VV2, G1, G2, G3 e PC1 foram classificados como arenosos, enquanto FG1 e PC2 são siltosos.

| Local de coleta  | pH do solo | P                             | C orgânico           |
|------------------|------------|-------------------------------|----------------------|
| PC1 <sup>1</sup> | 4,5        | 867,272 mg/dm <sup>3</sup>    | 10 g/dm <sup>3</sup> |
| PC2 <sup>1</sup> | 5,5        | 17.710,933 mg/dm <sup>3</sup> | 15 g/dm <sup>3</sup> |
| G1 <sup>2</sup>  | 3,6        | 1 mg/dm <sup>3</sup>          | 23 g/dm <sup>3</sup> |
| G2 <sup>2</sup>  | 3,6        | 1,8 mg/dm <sup>3</sup>        | 30 g/dm <sup>3</sup> |
| G3 <sup>2</sup>  | 3,8        | 0,5 mg/dm <sup>3</sup>        | 24 g/dm <sup>3</sup> |
| VV1 <sup>1</sup> | 4          | 266,376 mg/dm <sup>3</sup>    | 32 g/dm <sup>3</sup> |
| VV2 <sup>3</sup> | 3,9        | 0,9 mg/dm <sup>3</sup>        | 26 g/dm <sup>3</sup> |
| FG1 <sup>1</sup> | 4,5        | 167,259 mg/dm <sup>3</sup>    | 25 g/dm <sup>3</sup> |

P= Mehlich e C-orgânico= Walkey-Black

<sup>1</sup>PROTACHEVICZ, et al. submetido;

<sup>2</sup>PAULITSCH, et al. 2019<sup>a</sup>;

<sup>3</sup>KLEPA, et al. 2021;

**Tabela S2:** Anotação de genes relacionados a solubilização de fosfato encontrados na estirpe *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3281 via RAST. Alguns produtos não obtivemos o nome do gene referente nas plataformas de busca.

| Gene | ID RAST                  | Produto (EC No.)                                                          |
|------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| gcd  | 6666666.798865.peg. 3564 | Glicose desidrogenase PQQ dependente (EC 1.1.5.2)                         |
| pqq  | 6666666.798865.peg. 5496 | Pirroloquinolina quinona (EC 1.3.3.11)                                    |
| ppxi | 6666666.798865.peg. 1616 | Exopolifosfatase (EC 3.6.1.11)                                            |
| ppk  | 6666666.798865.peg. 1617 | Polifosfato quinase (EC 2.7.4.1)                                          |
| phoR | 6666666.798865.peg. 1618 | Regulador sensor de fosfato (EC 2.7.13.3)                                 |
| phoB | 6666666.798865.peg. 1619 | Regulador transcricional de fosfato                                       |
| phoU | 6666666.798865.peg. 1620 | Regulador transcricional de transporte de fosfato                         |
| pstB | 6666666.798865.peg. 1621 | Transportador ABC fosfato de ligação ATP                                  |
| pstA | 6666666.798865.peg. 1622 |                                                                           |
| pstC | 6666666.798865.peg. 1623 |                                                                           |
| pstS | 6666666.798865.peg. 1624 |                                                                           |
| glmM | 6666666.798865.peg. 1626 | Fosfoglucosamina mutase (EC 5.4.2.10)                                     |
|      | 6666666.798865.peg. 1830 | Fosfatase ácida (EC 3.1.3.2)                                              |
|      | 6666666.798865.peg. 2378 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 2380 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 2381 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 2382 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 3693 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 4618 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 4688 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 5515 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 5977 |                                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. 7541 |                                                                           |
| phnB | 6666666.798865.peg. 5397 | Permease                                                                  |
| phnB | 6666666.798865.peg. 5859 |                                                                           |
| phnB | 6666666.798865.peg. 5860 |                                                                           |
| phnB | 6666666.798865.peg. 3309 | Ligação DNA 3-dimetilubiquinona-9 3-metiltransferase proteína             |
| phnI | 6666666.798865.peg. 6345 | alfa-D-ribose 1 metilfosfonato 5 trifosfato sintase subunit (EC 2.7.8.37) |
| phnK | 6666666.798865.peg. 6346 | Proteína utilização de fosfonato ligada ATP                               |
| phnN | 6666666.798865.peg. 6353 | ribose 1,5 bifosfato fosfoquinase (EC 2.7.4.23)                           |
| phnC | 6666666.798865.peg. 6369 | Transportador ABC ligado ao ATP de fosfonato (TC 3.A.1.9.1)               |
| phnD | 6666666.798865.peg. 6368 | Transportador ABC ligado ao ATP de fosfonato (TC 3.A.1.9.1)               |
| phnE | 6666666.798865.peg. 6367 | Transportador ABC ligado ao ATP de fosfonato (TC 3.A.1.9.2)               |
| phnA | 6666666.798865.peg. 6339 | Proteína phnA                                                             |
| phnF | 6666666.798865.peg. 6351 | Regulador transcricional phnF                                             |
| phnG | 6666666.798865.peg. 6350 | alfa D ribose 1 metilfosfonato 5 trifosfato sintase (EC 2.7.8.37)         |
| phnH | 6666666.798865.peg. 6349 | Proteína sistema C-P liase fosfonato                                      |

|      |                     |      |                                                                                              |
|------|---------------------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| gnl  | 6666666.798865.peg. | 139  | 6 fosfogluconolactonase(EC 3.1.1.31)                                                         |
|      | 6666666.798865.peg. | 1843 | Glunolactonase (EC 3.1.1.17)                                                                 |
|      | 6666666.798865.peg. | 4100 |                                                                                              |
| gnd  | 6666666.798865.peg. | 6327 | 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44)                                                 |
|      | 6666666.798865.peg. | 4150 | gluconato desidratase(EC 4.2.1.39)                                                           |
|      | 6666666.798865.peg. | 4956 | 2 ceto 3 deoxigluconato permease(KDG permease)                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 2669 | Proteína membrana DUF2324 de 2-cetogluconato cluster                                         |
|      | 6666666.798865.peg. | 592  | Proteína transportadora família gluconato                                                    |
|      | 6666666.798865.peg. | 594  | Fosfogluconato desidratase (EC 4.2.1.12)                                                     |
|      | 6666666.798865.peg. | 1862 | Gluconato 2-desidrogenase ligação de membrana , gamma subunit (EC 1.1.99.3)                  |
|      | 6666666.798865.peg. | 1863 | Gluconate 2-desidrogenase , membrane-bound, flavoprotein (EC 1.1.99.3)                       |
|      | 6666666.798865.peg. | 1864 | Gluconato 2-desidrogenase ligação de membrana , cytochrome c (EC 1.1.99.3)                   |
|      | 6666666.798865.peg. | 2670 | 2 cetogluconato utilization repressor PtxS                                                   |
|      | 6666666.798865.peg. | 2671 | 2 cetogluconato 6-fosfato reductase (EC 1.1.1.43)                                            |
|      | 6666666.798865.peg. | 2672 | 2 cetogluconato transportador                                                                |
|      | 6666666.798865.peg. | 2673 | 2 cetogluconato quinase (EC 2.7.1.13)                                                        |
| poxB | 6666666.798865.peg. | 168  | piruvate desidrogenase quinone (EC 1.2.5.1)                                                  |
|      | 6666666.798865.peg. | 2904 | Dihidrolipoamido desidrogenase of piruvato desidrogenase complex (EC 1.8.1.4)                |
|      | 6666666.798865.peg. | 2905 | Dihidrolipoamido acetiltransferase component of piruvato desidrogenase complex (EC 2.3.1.12) |
|      | 6666666.798865.peg. | 2906 | Piruvato desidrogenase E1 component (EC 1.2.4.1)                                             |
|      | 6666666.798865.peg. | 1208 |                                                                                              |
| aldB | 6666666.798865.peg. | 1299 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 2104 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 2263 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 2277 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 3332 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 3555 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 3680 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 4152 | Acetiltransferase desidrogenase (EC 1.2.1.3)                                                 |
|      | 6666666.798865.peg. | 4161 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 4195 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 4276 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 4720 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 6028 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 7263 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 7464 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 7390 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 8536 |                                                                                              |
| acs  | 6666666.798865.peg. | 6452 |                                                                                              |
|      | 6666666.798865.peg. | 3455 | Acetoacetil-CoA sintetase(EC 6.2.1.16)                                                       |
|      | 6666666.798865.peg. | 3670 |                                                                                              |
| aceA | 6666666.798865.peg. | 2798 | Isocitrato liase(EC 4.1.3.1)                                                                 |

|      |                     |      |                                               |
|------|---------------------|------|-----------------------------------------------|
|      | 6666666.798865.peg. | 959  |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 4743 |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 3709 |                                               |
| gltA | 6666666.798865.peg. | 2638 | Citrato sintase(EC 2.3.3.1)                   |
|      | 6666666.798865.peg. | 2287 |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 1145 |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 226  |                                               |
| glc  | 6666666.798865.peg. | 2802 | Malato sintase(EC 2.3.3.9)                    |
| mdh1 | 6666666.798865.peg. | 1152 | malato desidrogenase (EC 1.1.1.37)            |
|      | 6666666.798865.peg. | 809  |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 2317 |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 4741 | D 3 fosfoglicerato desidrogenase(EC 1.1.1.95) |
|      | 6666666.798865.peg. | 6013 |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 7400 |                                               |
|      | 6666666.798865.peg. | 7472 |                                               |
| gyar | 6666666.798865.peg. | 1697 | Glioxilato redutase(EC 1.1.1.79)              |
| pcc  | 6666666.798865.peg. | 3549 | Fosfoenolpiruvato carboxilase(EC 4.1.1.31)    |

**Tabela S3:** Anotação de genes relacionados a solubilização de fosfato encontrados na estirpe *Paraburkholderia quartelaensis* CNPSO 3008<sup>†</sup> via RAST. Alguns produtos não apresentam o nome do gene referente nas plataformas de busca.

| Gene | ID RAST                  | Produto (EC No.)                                         |
|------|--------------------------|----------------------------------------------------------|
| gcd  | 6666666.372737.peg. 5512 | Glicose desidrogenase (EC 1.1.5.2)                       |
| pqq  | 6666666.372737.peg. 7416 | Pirroloquinoline (EC 1.3.3.11)                           |
| ppxi | 6666666.372737.peg. 575  | Exopolifosfatase (EC 3.6.1.11)                           |
| ppk  | 6666666.372737.peg. 576  | Polifosfato quinase (EC 2.7.4.1)                         |
| phoR | 6666666.372737.peg. 577  | Proteína do sensor regulador de fosfato (EC 2.7.13.3)    |
| phoB | 6666666.372737.peg. 578  | Regulador da transcrição do regulador de fosfato         |
| phoU | 6666666.372737.peg. 579  | Regulador do sistema de transporte de fosfato            |
| pstB | 6666666.372737.peg. 580  |                                                          |
| pstA | 6666666.372737.peg. 581  | Proteína de ligação de ATP transportadora de fosfato ABC |
| pstC | 6666666.372737.peg. 582  |                                                          |
| pstS | 6666666.372737.peg. 584  |                                                          |
| glmM | 6666666.372737.peg. 586  | Fosfoglusamina mutase                                    |
|      | 6666666.372737.peg. 512  |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 1896 |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 229  |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 2512 |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 3131 | Fosfatase ácida (EC 3.1.3.2)                             |
|      | 6666666.372737.peg. 4241 |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 5035 |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 5073 |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 6043 |                                                          |
|      | 6666666.372737.peg. 8768 |                                                          |

|      |                                 |                                                                              |
|------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| phnB | <u>6666666.372737.peg. 6894</u> | Proteína domínio 3-dimetilubiquinona-9,3-metiltransferase DNA de ligação     |
|      | <u>6666666.372737.peg. 5127</u> |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 5126</u> |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 2325</u> |                                                                              |
| phnC | <u>6666666.372737.peg. 5432</u> | Transportador fosfonato ABC ligado ATP (T.C 3.A.1.9.1)                       |
| phnD | <u>6666666.372737.peg. 5433</u> | Transportador fosfonato ABC ligado ATP (T.C 3.A.1.9.1)                       |
| phnE | <u>6666666.372737.peg. 5434</u> | Transportador fosfonato ABC ligado ATP (T.C 3.A.1.9.1)                       |
| phnN | <u>6666666.372737.peg. 5449</u> | Ribose 1,5 bifosfato quinase (EC 2.7.4.23)                                   |
| phnF | <u>6666666.372737.peg. 5451</u> | Regulador transcricional PhnF                                                |
| phnG | <u>6666666.372737.peg. 5452</u> | alfa-D-ribose-1-metilfosfonato 5 trifosfato sintase subunidade (EC 2.7.8.37) |
| phnH | <u>6666666.372737.peg. 5453</u> | Proteína sistema fosfanato C-P liase                                         |
| phnI | <u>6666666.372737.peg. 5454</u> | alfa-D-ribose-1-metilfosfonato 5 trifosfato sintase subunidade (EC 2.7.8.37) |
| phnK | <u>6666666.372737.peg. 5456</u> | Proteína ligação ATP utilização fosfonatos                                   |
| phnL | <u>6666666.372737.peg. 5457</u> | alfa-D-ribose-1-metilfosfonato 5 trifosfato sintase subunidade (EC 2.7.8.37) |
| phnA | <u>6666666.372737.peg. 5463</u> | Proteína phnA                                                                |
| phnF | <u>6666666.372737.peg. 6231</u> | Regulador transcricional PhnF                                                |
| gnl  | <u>6666666.372737.peg. 4783</u> | Gluconolactonase (EC 3.1.1.17)                                               |
|      | <u>6666666.372737.peg. 2243</u> |                                                                              |
| gnl  | <u>6666666.372737.peg. 3744</u> | 6-fosfogluconolactonase tipo eucariótico (EC 3.1.1.31)                       |
| poxB | <u>6666666.372737.peg. 3714</u> | piruvato desidrogenase quinone (EC 1.2.5.1)                                  |
|      | <u>6666666.372737.peg. 4220</u> |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 170</u>  |                                                                              |
| aldB | <u>6666666.372737.peg. 2003</u> | aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3)                                           |
|      | <u>6666666.372737.peg. 527</u>  |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 439</u>  |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 384</u>  |                                                                              |
| aceA | <u>6666666.372737.peg. 1271</u> | Isocitrato liase (EC 4.1.3.1)                                                |
|      | <u>6666666.372737.peg. 5783</u> |                                                                              |
| gltA | <u>6666666.372737.peg. 81</u>   | Citrato sintase (EC 2.3.3.1)                                                 |
|      | <u>6666666.372737.peg. 495</u>  |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 971</u>  |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 2881</u> |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 4504</u> |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 5262</u> |                                                                              |
|      | <u>6666666.372737.peg. 8067</u> |                                                                              |
| gltB | <u>6666666.372737.peg. 5787</u> | Malato sintase (EC 2.3.3.9)                                                  |
| mdh1 | <u>6666666.372737.peg. 365</u>  | Malato desidrogenase (EC 1.1.1.37)                                           |
| mdh2 | <u>6666666.372737.peg. 964</u>  |                                                                              |
| gyar | <u>6666666.372737.peg. 655</u>  | Glioxilato redutase (EC 1.1.1.79)                                            |
|      | <u>6666666.372737.peg. 84</u>   | D-3-fosfoglicerato desidrogenase (EC 1.1.1.95)                               |
|      | <u>6666666.372737.peg. 2913</u> |                                                                              |

|     |                                 |                                             |
|-----|---------------------------------|---------------------------------------------|
|     | <u>6666666.372737.peg. 3345</u> |                                             |
|     | <u>6666666.372737.peg. 3443</u> |                                             |
|     | <u>6666666.372737.peg. 5264</u> |                                             |
|     | <u>6666666.372737.peg. 5386</u> |                                             |
|     | <u>6666666.372737.peg. 6237</u> |                                             |
|     | <u>6666666.372737.peg. 8980</u> |                                             |
| pcc | 6666666.372737.peg. 6820        | Fosfoenolpiruvato carboxilase (EC 4.1.1.31) |

**Tabela S4:** Anotação de genes relacionados a solubilização de fosfato encontrados na estirpe *Paraburkholderia nodosa* BR3437 via RAST. Alguns produtos não apresentam o nome do gene referente nas plataformas de busca.

| Gene | ID RAST                         | Produto (EC No.)                                                               |
|------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| gcd  | 6666666.866046.peg. 3564        | Glicose desidrogenase (EC 1.1.5.2)                                             |
|      | <u>6666666.866046.peg. 1617</u> |                                                                                |
|      | <u>6666666.866046.peg. 3139</u> |                                                                                |
|      | <u>6666666.866046.peg. 3722</u> |                                                                                |
|      | <u>6666666.866046.peg. 5689</u> |                                                                                |
|      | <u>6666666.866046.peg. 6685</u> | Fosfatase ácida (EC 3.1.3.2)                                                   |
|      | <u>6666666.866046.peg. 7776</u> |                                                                                |
|      | <u>6666666.866046.peg. 8135</u> |                                                                                |
|      | <u>6666666.866046.peg. 8922</u> |                                                                                |
| ppxi | 6666666.866046.peg. 8323        | Exopolifosfatase (EC 3.6.1.11)                                                 |
| ppk  | 6666666.866046.peg. 8324        | Polifosfato quinase (EC 2.7.4.1)                                               |
| phoR | 6666666.866046.peg. 8325        | Proteína sensor regulador fosfato (EC 2.7.13.3)                                |
| phoB | 6666666.866046.peg. 8326        | Proteína reguladora transcrição reguladora fosfato                             |
| phoU | 6666666.866046.peg. 8327        | Proteína reguladora sistema transporte fosfato                                 |
| pstB | 6666666.866046.peg. 8328        |                                                                                |
| pstA | 6666666.866046.peg. 8329        |                                                                                |
| pstC | 6666666.866046.peg. 8330        | Proteína ligação ATP transportadora fosfato ABC                                |
| pstS | 6666666.866046.peg. 8331        |                                                                                |
| pqq  | 6666666.866046.peg. 3178        | Pirroloquinolina (EC 1.3.3.11)                                                 |
| phnB | 6666666.866046.peg. 4477        | putative DNA binding 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase domain protein |
| phnB | 6666666.866046.peg. 4478        |                                                                                |
| phnC | 6666666.866046.peg. 1150        | Transportador ABC ligado ao ATP de fosfonato(TC 3.A.1.9.1)                     |
| phnD | 6666666.866046.peg. 1151        |                                                                                |
| phnE | 6666666.866046.peg. 1152        | Transportador ABC ligado ao ATP de fosfonato(TC 3.A.1.9.2)                     |
| phnN | 6666666.866046.peg. 1181        | ribose 1,5 bifosfato fosfoquinase(EC 2.7.4.23)                                 |
| phnF | 6666666.866046.peg. 1183        | Regulador transcricional phnF                                                  |
| phnG | 6666666.866046.peg. 1184        | alfa D ribose 1 metilfosfonato 5 trifosfato sintase (EC 2.7.8.37)              |
| phnH | 6666666.866046.peg. 1185        | Proteína sistema C-P liase fosfonato                                           |
| phnI | 6666666.866046.peg. 1186        | alfa D ribose 1 metilfosfonato 5 trifosfato sintase (EC 2.7.8.37)              |
| phnK | 6666666.866046.peg. 1188        | phosphonates utilization ATP-binding protein                                   |
| phnL | 6666666.866046.peg. 1189        | alfa D ribose 1 metilfosfonato 5 trifosfato sintase (EC 2.7.8.37)              |

|      |                     |      |                                               |
|------|---------------------|------|-----------------------------------------------|
| phnA | 6666666.866046.peg. | 554  | Proteína phnA                                 |
| phnA | 6666666.866046.peg. | 1196 |                                               |
| gnl  | 6666666.866046.peg. | 3327 | glunolactonase (EC 3.1.1.17)                  |
| gnl  | 6666666.866046.peg. | 5325 |                                               |
| gnl  | 6666666.866046.peg. | 8936 |                                               |
| poxB | 6666666.866046.peg. | 4343 | piruvate desidrogenase quinone (EC 1.2.5.1)   |
| aldB | 6666666.866046.peg. | 2364 | Acetiltransferase desidrogenase (EC 1.2.1.3)  |
| aldB | 6666666.866046.peg. | 2220 |                                               |
| aldB | 6666666.866046.peg. | 2134 |                                               |
| aldB | 6666666.866046.peg. | 1869 |                                               |
| aceA | 6666666.866046.peg. | 2916 | Isocitrato liase(EC 4.1.3.1)                  |
| aceA | 6666666.866046.peg. | 3547 |                                               |
| aceA | 6666666.866046.peg. | 8238 |                                               |
| gltA | 6666666.866046.peg. | 766  | Citrato sintase(EC 2.3.3.1)                   |
| gltA | 6666666.866046.peg. | 1461 |                                               |
| gltA | 6666666.866046.peg. | 2199 |                                               |
| gltA | 6666666.866046.peg. | 4403 |                                               |
| gltA | 6666666.866046.peg. | 7607 |                                               |
| gltA | 6666666.866046.peg. | 8150 |                                               |
| glcB | 6666666.866046.peg. | 2920 | Malato sintase(EC 2.3.3.9)                    |
| mdh1 | 6666666.866046.peg. | 8568 | Malato desidrogenase (EC 1.1.1.37)            |
| mdh1 | 6666666.866046.peg. | 2633 |                                               |
| mdh1 | 6666666.866046.peg. | 1454 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 49   | D 3 fosfoglicerato desidrogenase(EC 1.1.1.95) |
|      | 6666666.866046.peg. | 763  |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 1862 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 2169 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 4759 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 5842 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 5889 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 6741 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 7752 |                                               |
|      | 6666666.866046.peg. | 8069 |                                               |
| gyrA | 6666666.866046.peg. | 6148 | Glioxilato redutase(EC 1.1.1.79)              |
| pcc  | 6666666.866046.peg. | 7430 | Fosfoenolpiruvato carboxilase(EC 4.1.1.31)    |

**Tabela S5:** Valores de IS das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio em meio NBRIP sólido em triplicata.

| <b>Estirpe</b> | <b>IS 3 dias</b> |      |     | <b>IS 7 dias</b> |     |     | <b>IS 15 dias</b> |     |     | <b>IS 21 dias</b> |     |     |
|----------------|------------------|------|-----|------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|
| G 38.10        | 1,8              | 1,8  | 1,7 | 2,3              | 2,1 | 2,1 | 2,8               | 3,4 | 2,2 | 2,8               | 2,8 | 2,8 |
| PC 05.02       | -                | -    | -   | -                | -   | -   | 1,6               | 1,8 | 1,7 | 2,1               | 2,1 | 2,2 |
| G 26.01        | 1,2              | 1,2  | 1   | 1,7              | 1,4 | 1,3 | 2                 | 2,1 | 2,1 | 2,5               | 2,5 | 2,3 |
| FG 19.01       | 1,3              | 1,5  | 1   | 1,5              | 1,5 | 1,2 | 1,5               | 1,5 | 1,2 | 1,5               | 1,4 | 1,7 |
| PC 02.04       | -                | -    | -   | -                | -   | -   | 1,5               | 1,3 | 1,2 | 1,2               | 1,8 | 1,3 |
| G 31.10        | -                | -    | -   | 2,2              | 1,6 | 2,1 | 2,1               | 1,8 | 2,3 | 2,3               | 2,3 | 2,5 |
| G 20.01        | 2                | 1,9  | 2   | 2                | 2,2 | 2,2 | 2,5               | 2,8 | 2,5 | 2,5               | 3,1 | 2,6 |
| FG 19.06       | -                | -    | -   | 1,5              | 1,5 | 1,5 | 1,5               | 1,4 | 1,7 | 2,1               | 2,1 | 2,2 |
| VV 33.01       | -                | -    | -   | 2                | 1,6 | 1,8 | 2,1               | 3   | 2,1 | 2,3               | 2,1 | 3,1 |
| G 15.02        | 1,2              | 1,3  | 1   | 1,5              | 1,5 | 1,5 | 1,8               | 1,8 | 2,1 | 2,5               | 1,8 | 2,3 |
| G 14.01        | 1,8              | 1,8  | 1,6 | 1,6              | 1,8 | 2,1 | 2,6               | 2,8 | 3   | 2,8               | 2,8 | 3   |
| G 38.02        | -                | -    | -   | -                | -   | -   | 1,3               | 1,2 | 1,2 | 1,6               | 1,6 | 1,6 |
| VV 05.12       | 1,6              | 1,6  | 1,6 | 2,1              | 2,3 | 2   | 2,3               | 2,6 | 2,1 | 2,5               | 2,8 | 2,5 |
| PC 03.02       | -                | -    | -   | -                | -   | -   | 2,1               | 2,1 | 2,1 | 2,7               | 2,8 | 2,7 |
| PC 01.04       | 1,25             | 1,25 | 1,4 | 1,4              | 1,6 | 1,6 | 1,8               | 1,8 | 1,8 | 1,8               | 2   | 1,8 |

**Tabela S6:** Solubilização de fosfato de cálcio (mg/L) em meio NBRIP líquido após três dias (Sol. 3D) e sete dias (Sol. 7D) de incubação com os respectivos valores de pH dos cultivos em cada dia de avaliação (pH 3D e pH 7D). Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas entre as estirpes nos mesmos períodos e as letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os dois períodos de incubação para uma mesma estirpe.

| Estirpe                                | Sol. 3D                 | pH 3D                | Sol. 7D                 | pH 7D                |
|----------------------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| <i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3003     | 206,8 Bb<br>(± 6,737)   | 4,85 Ab<br>(± 0,016) | 356,3 Aa<br>(± 0,942)   | 4,53 Aa<br>(± 0,018) |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3076 | 240 Ab<br>(± 17,752)    | 5 Bb<br>(± 0,071)    | 367,6 Aa<br>(± 17,206)  | 4,5 Aa<br>(± 0,004)  |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3281 | 112,06 Db<br>(± 16,819) | 5,2 Cb<br>(± 0,014)  | 186,06 Ba<br>(± 5,671)  | 4,8 Ca<br>(± 0,009)  |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 2998            | 112,47 Da<br>(± 8,021)  | 5,49 Db<br>(± 0,021) | 110,67 Ca<br>(± 17,327) | 5 Da<br>(± 0,021)    |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3006            | 173,5 Cb<br>(± 0,816)   | 4,97 Bb<br>(± 0,008) | 341,6 Aa<br>(± 22,451)  | 4,69 Ba<br>(± 0,012) |

**Tabela S7:** Solubilização de fosfatos de ferro (mg/L) em meio NBRIP líquido da estirpe após três dias (Sol. 3D) e sete dias (Sol. 7D) de incubação com os respectivos valores de pH dos cultivos em cada dia de avaliação (pH 3D e pH 7D). As letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os dias de solubilização para cada fosfato.

| Estirpe                                | Sol. 3D                    | pH 3D                      | Sol. 7D                    | pH 7D                      |
|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>P. quartelaensis</i> CNPSO 3003     | 0 Ca                       | 4,38 Ab<br>( $\pm 0,016$ ) | 0 Ca                       | 4,01 Ba<br>( $\pm 0,016$ ) |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3076 | 0 Cb                       | 5,45 Cb<br>( $\pm 0,057$ ) | 6,17 Aa<br>( $\pm 0,124$ ) | 4,26 Ca<br>( $\pm 0,077$ ) |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3281 | 1,69 Bb<br>( $\pm 0,369$ ) | 4,52 Bb<br>( $\pm 0,020$ ) | 5,33 Ba<br>( $\pm 0,748$ ) | 3,91 Aa<br>( $\pm 0,021$ ) |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 2998            | 3,15 Aa<br>( $\pm 0,118$ ) | 5,48 Cb<br>( $\pm 0,152$ ) | 0 Cb                       | 4,24 Ca<br>( $\pm 0,009$ ) |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3006            | 0 Ca                       | 4,28 Aa<br>( $\pm 0,028$ ) | 0 Ca                       | 4,25 Ca<br>( $\pm 0,016$ ) |

**Tabela S8:** Solubilização de fosfatos de alumínio (mg/L) em meio NBRIP líquido da estirpe após três dias (Sol. 3D) e sete dias (Sol. 7D) de incubação com os respectivos valores de pH dos cultivos em cada dia de avaliação (pH 3D e pH 7D). As letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os dias de solubilização para cada fosfato.

| Estirpe                                | Sol. 3D                    | pH 3D                      | Sol. 7D                    | pH 7D                      |
|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>P. quartelaensis</i> CNPSO 3003     | 2,70 Cb<br>( $\pm 0,093$ ) | 3,89 Aa<br>( $\pm 0,038$ ) | 3,83 Ca<br>( $\pm 0,145$ ) | 3,84 Aa<br>( $\pm 0,033$ ) |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3076 | 3,84 Ab<br>( $\pm 0,134$ ) | 4,96 Db<br>( $\pm 0,067$ ) | 4,49 Aa<br>( $\pm 0,254$ ) | 3,72 Aa<br>( $\pm 0,029$ ) |
| <i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSO 3281 | 3,51 Ba<br>( $\pm 0,082$ ) | 4,21 Ba<br>( $\pm 0,012$ ) | 4,22 Ba<br>( $\pm 0,361$ ) | 3,86 Aa<br>( $\pm 0,214$ ) |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 2998            | 3,36 Ba<br>( $\pm 0,042$ ) | 5,04 Eb<br>( $\pm 0,038$ ) | 3,17 Da<br>( $\pm 0,302$ ) | 4,19 Ba<br>( $\pm 0,208$ ) |
| <i>P. nodosa</i> CNPSO 3006            | 0 Db                       | 4,42 Ca<br>( $\pm 0,016$ ) | 1,42 Ea<br>( $\pm 0,360$ ) | 4,44 Ba<br>( $\pm 0,012$ ) |

**Figura S1:** Imagens de fotodocumentador para as colônias das estirpes avaliadas, com halos de solubilização de fosfato, com seus respectivos dias de análise (3, 7, 15 e 21).

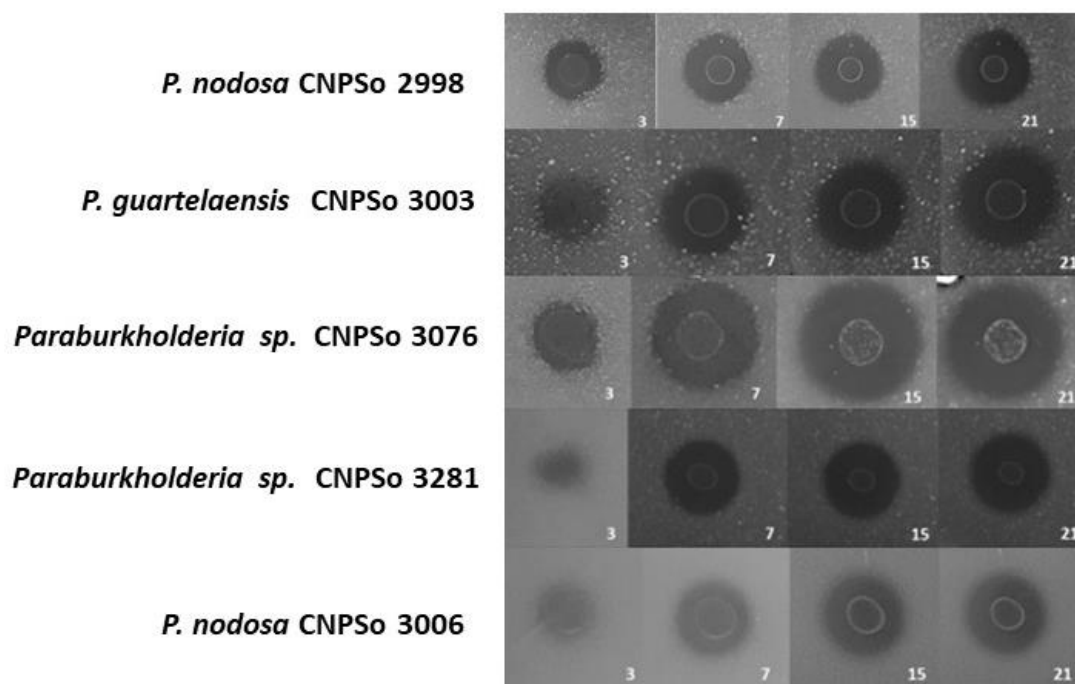


**Figura S2:** Anotação dos genes *phoUBR*, *pstSCAB*, *ppxi* e *ppk* nos genomas de estirpes de *Paraburkholderia* sp. solubilizadoras de fosfato. Cada seta representa um gene de acordo com a posição e o sentido em que se encontra no genoma analisado.

