

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO INTERGÊNICA 16S-23S rRNA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SORGO

Larissa B. da Silva^{*1} (PG), Lucas L. da Silva¹ (PG), Enderson P. B. Ferreira² (PQ), Karina F. D. N. Santos¹ (PQ), Plínio L. F. Naves¹ (PQ), Claudia C. G. Martin-Didonet¹ (PQ).

¹Br 153, Nº3105 Fazenda Barreiro do Meio, Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas – CCET, Anápolis, GO. (PG) silvalariissals@gmail.com

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. (PQ)

Resumo: A reação em cadeia da polimerase (PCR) pela sua versatilidade é uma das principais técnicas moleculares utilizadas para avaliações apuradas de diversidade por meio da análise da região espaçadora intergênica 16S e 23S rRNA. O presente trabalho realizou a caracterização molecular de bactérias isoladas de sorgo cultivado no Cerrado goiano. O DNA extraído de 24 bactérias e estirpes padrão (FP2, PAL5 e BR322) foi submetido a PCR utilizando os *primers* pHr e p23S para amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese e permitiu verificar a amplificação de 1 a 12 fragmentos com variação de tamanhos. A partir desses dados foi elaborada uma matriz binária agrupada por UPGMA e gerado um dendograma de similaridade pelo coeficiente de Jaccard. Por essa análise foi possível observar formação de 8 grupos considerando 60% de similaridade entre as bactérias avaliadas. Desta forma foi constatada diversidade entre os 24 isolados bacterianos obtidos de sorgo cultivado no Cerrado.

Palavras-chave: Microrganismos. Técnicas moleculares. PCR. Região espaçadora.

Introdução

Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas foram durante séculos amplamente utilizados na identificação de bactérias. Todavia, para tal abordagem era imprescindível a obtenção de culturas puras, fator limitante ao estudo, visto que a maior parte dos microrganismos não é cultivável por técnicas laboratoriais de rotina (BITTENCOURT, 2005; NEIVERTH, 2012). Nas últimas décadas o interesse em estudos taxonômicos microbianos ganhou novas perspectivas em decorrências do desenvolvimento de diversas técnicas de biologia molecular, que tornaram possível a identificação e classificação rápida e precisa desses organismos (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

Entre as tecnologias empregadas, que visam a obtenção de dados moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada. Seu uso é privilegiado pela precisão, rapidez e sensibilidade que a técnica apresenta. Por meio da PCR é possível que fragmentos específicos do genoma

bacteriano sejam amplificados *in vitro* em uma proporção exponencial. A técnica de PCR consiste em alterações de temperatura que promovem a desnaturação do DNA, o anelamento de iniciadores (*primers*) complementares a determinada sequência do genoma e por fim, a extensão promovida por uma polimerase termoestável (*Taq* polimerase) (SAIKI et al., 1985; KRISHNAN, 2015).

A eletroforese em gel de agarose por sua vez é outra técnica molecular amplamente utilizada, e permite separar o DNA amplificado com base no tamanho sendo utilizada em conjunto para a análise dos fragmentos obtidos pela PCR. A agarose forma uma matriz que atua como filtro molecular. Após ser depositado em pequenos poços feitos no gel o DNA será submetido a uma corrente elétrica. Uma vez que a carga global do DNA é negativa, ele será atraído em direção ao polo positivo separando os fragmentos de acordo com sua dificuldade em transpor a matriz (MAGALHÃES et al., 2005; GANDRA et al., 2008).

As técnicas moleculares, comumente, são empregadas para a caracterização genética permitindo o estudo das moléculas tanto de DNA quanto RNA (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999). Em microbiologia os rRNA (RNA ribossômico) são hoje considerados as moléculas mais adequadas para estudos de diversidade (REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006). As principais vantagens é que os genes de rRNA se encontram universalmente distribuídos e permanecem altamente conservados em toda a sua extensão e estrutura. Assim, no caso de eventuais substituições de nucleotídeos, esses passam a funcionar como um relógio para a história evolutiva do organismo (BITTENCOURT, 2005; REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006).

O RNA bacteriano apresenta três genes distintos (rRNAs 16S, 23S e 5Ss) e exibem uma organização em operons como unidades de transcrição funcional. De modo geral esse tipo de organização consiste em uma região promotora, uma sequência que codifica o rRNA 16S, um espaçador ou uma sequência intergênica (que pode apresentar sequências de codificação para tRNA), uma sequência codificadora de rRNA 23S, e em seguida a sequência que codifica o rRNA 5S. (GURTLE, STANISICH, 1996; BARRY et al., 1991).

A análise da região espaçadora intergênica localizada entre os genes 16S e 23s é bastante utilizada em avaliações genéticas de procariotos. Isso acontece pelo fato de ser uma sequência altamente variável, e estar localizada entre regiões altamente conservadas do genoma bacteriano (16S-23S rRNAs), a tornando ideal

para análises mais apuradas de diversidade intra e inter-específica entre indivíduos com elevado grau de semelhança genética, permitindo a identificação de polimorfismo (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999; REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006, BOAKYE et al., 2016).

Tendo em vista a ampla diversidade microbiológica presente no Cerrado, o presente trabalho tem por objetivo realizar a caracterização molecular por meio da PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de bactérias isoladas de sorgo cultivado no Cerrado goiano.

Material e Métodos

Bactérias e meios de cultivo

Foram utilizadas 24 bactérias isoladas de sorgo selecionadas em meios semisseletivos: NFb-lactato (PEDROSA; YATES, 1984), LGI-P (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999) e meio YMA (HUNGRIA; ARAUJO, 1994), e estirpes padrão FP2 -*Azospirillum brasilense*, Pal5 - *Gluconacetobacter diazotrophicus* (cedidas pela UFPR) e BR322 - *Rhizobium tropici* (cedidas pela Embrapa).

Extração de DNA

As amostras crescidas por 24h em meio/caldo NFb-Lactato, LGI-P e YMA acrescidos de 10 µg mL⁻¹ de ampicilina e 20 µg mL⁻¹ de ácido nalidíxico foram submetidas ao procedimento de extração de DNA se de acordo com a metodologia de Reis Júnior et al. (2004) com adaptações segundo de Oliveira (2016).

Amplificação em PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA e eletroforese

Os DNAs extraídos dos 24 isolados de sorgo e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 foram utilizados na caracterização molecular realizada através da técnica de PCR. A amplificação em PCR foi realizada para a região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA onde foram utilizados os *primers*: pHr (5'-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3') e p23S (5'- GGC TGC TTC T AA GCC AAC-3') (MASSOL-DEYA et al., 1995) (Tabela 1).

Os ciclos de amplificação PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA ocorreram segundo o protocolo descrito por Reis Júnior et al. (2004) com

modificações. A amplificação por PCR consistiu em quatro etapas: primeiro a desnaturação inicial ocorrida a uma temperatura de 94 °C durante 4 minutos em apenas um ciclo; a segunda etapa englobou a desnaturação a 94°C por um minuto, seguida do anelamento a 62°C por 45 segundos e extensão com temperatura de 72°C também por 45 segundos com 30 repetições e finalmente a extensão terminal a 75°C durante cinco minutos composta por apenas um ciclo.

Tabela 1. Composição da mistura reacional para a PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA.

Mistura reacional para PCR	Volume
H ₂ O estéril	14,6 µL
Tampão PCR - <i>GeneDireX</i> ®	2,0 µL
Dntp	0,2 µL
Primer 1 <i>Sigma-Aldrich</i> ®	0,2 µL
Primer 2 <i>Sigma-Aldrich</i> ®	0,2 µL
Taq polimerase - <i>GeneDireX</i> ®	1,5 U
DNA	1,0 µL
Volume da Reação	20 µL

Os produtos de PCR obtidos da amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S foram revelados por eletroforese com gel de agarose. Para isso foi utilizada uma amostra de 1µL da reação de PCR, e gel de agarose 1,2% imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA, pH 8,0), sendo aplicada uma corrente elétrica de 90 volts durante 1 h. Para comparação do padrão eletroforético obtido foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb-DNA-Ladder da BioLabs®. O gel foi corado em brometo de etídio (1 mg mL⁻¹) (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989) e então observado e fotografado por meio do transiluminador UV Multi Doc-It Imaging System® (UVD) com câmera digital acoplada.

Análise de similaridade

A partir do padrão eletroforético obtido da amplificação em PCR para a região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA foi elaborada uma matriz binária (presença/ausência) para avaliação de similaridade entre as bactérias estudadas. Os resultados foram estimados pelo coeficiente de similaridade de Jaccard (J), utilizando o método das médias das distâncias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), para gerar o dendrograma no software NTSYSpc 2.02i Applied Biostatistics (SILVA RODRIGUES et al., 2006).

Resultados e Discussão

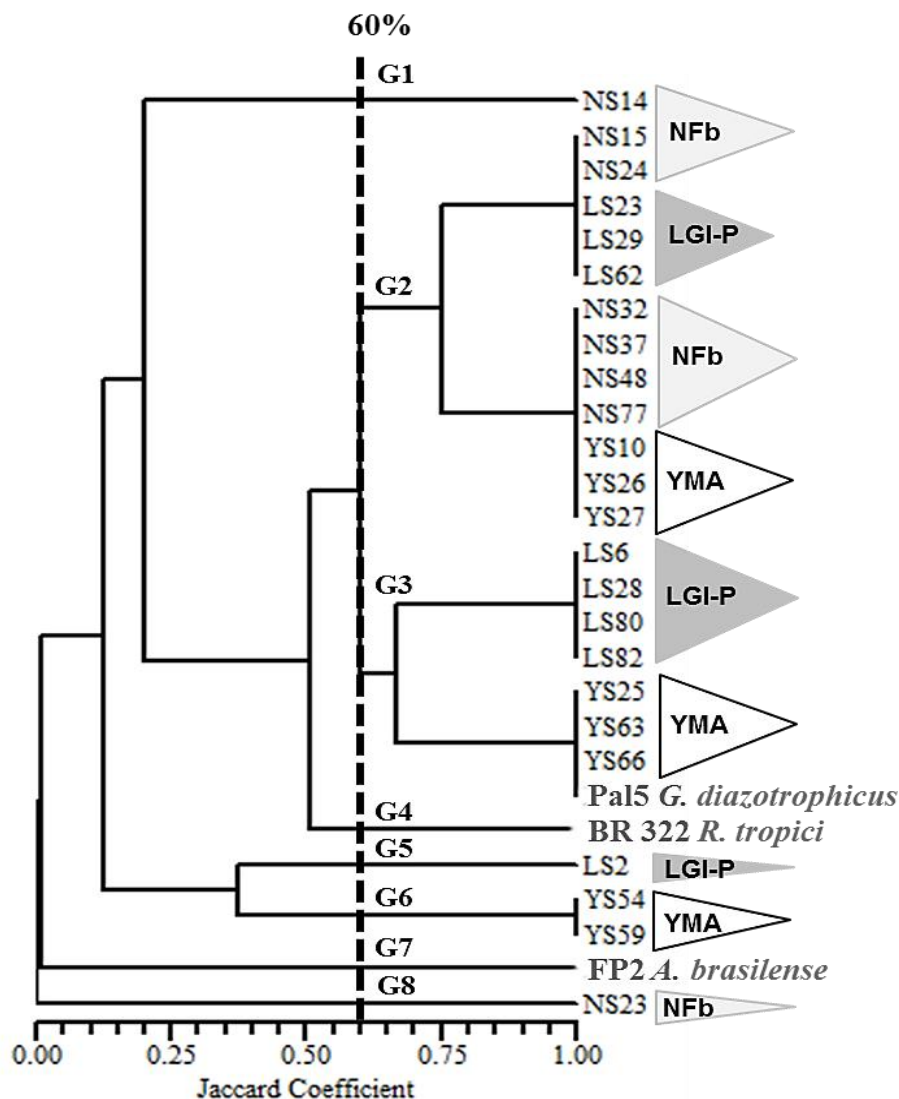
A PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA dos 24 isolados avaliados permitiu a obtenção de 1 a 12 fragmentos distribuídos entre 3 e 0,8 kpb (kilo pares de bases). Oliveira (2016) verificou que para bactérias endofíticas de arroz os produtos de PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA eram de 1 a 3 com tamanho variando entre 0,7 e 1,5 kpb.

Segundo Jensen, Webster e Straus (1993) é difícil prever como os tamanhos dos produtos de amplificação variam dentro de uma gama de organismos procariotos. Isso acontece, pois, produtos da PCR da região intergênica 16S-23S rRNA geralmente se apresentam de maneira diversa nos diferentes organismos (REIS JUNIOR et al. (2006).

A amplificação dos genes entre a sequência 16S-23S do rRNAs é a abordagem ideal para uma discriminação à nível intra-específico. Isso porque, as variações na composição e / ou comprimento da sequência proporcionada pelos diferentes tipos de *operons* da região intergênica 16S-23S rRNA ocorrem até mesmo entre microrganismos de uma mesma espécie (LAGUERRE, et al., 1996; DINGMAN, 2012; BOAKYE et al. 2016). Assim utilizando esta técnica foi possível a observação da variação genética nas bactérias avaliadas.

A partir do perfil eletroforético dos produtos de PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA foi possível obter um dendrograma de similaridade com a formação de oito grupos com similaridade de 60% entre as bactérias avaliadas (Figura 1). O grupo cujo G2 foi o mais numeroso agrupando 12 dos 24 isolados bacterianos analisados, além disso, o grupo apresentou a formação de dois subgrupos com cinco e sete isolados apresentando 100% de similaridade entre si (Figura 1).

Figura 1. Dendrograma gerado no software NTSYSpc (versão 2.02i) definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região intergênica 16S-23S rRNA por PCR de realizado para 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), Pal5 (*G. diazotrophicus*) e BR322 (*R. tropici*)



O grupo G3 também composto por dois subgrupos com agrupamentos de quatro isolados similares em 100% e três isolados com similaridade de 100% com a estirpe padrão Pal5 foi o segundo mais numeroso (Figura 1). Os grupos G1, G4, G5, G7 e G8 apresentaram apenas um componente (Figura 1) e o G6 foi composto por dois isolados YS54 e YS59 com similaridade de 100%.

O dendrograma (Figura 1) permite verificar que uma tendência de agrupamento entre isolados obtidos de um mesmo meio de cultura indicando que os meios de cultivo foram determinantes para o isolamento de organismos semelhantes quanto a região intergênica 16S-23S rRNA.

Pelos dados obtidos foi possível corroborar a efetividade desta estratégia baseada na amplificação da região espaçadora intergênica e inferir que há variabilidade genética entre as 24 bactérias isoladas de sorgo avaliadas. A partir deste estudo, as bactérias associadas ao sorgo poderão ser utilizadas para avaliação por sequenciamento de outros genes, como 16S rRNA, para ser realizado a determinação taxonômica definitiva dos isolados, podendo fornecer maiores informações sobre o papel ecológico destes microrganismos endofíticos de plantas cultivadas no Cerrado goiano.

Conclusão

A amplificação pela técnica de PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA permitiu constatar a diversidade genética entre as 24 bactérias isoladas de raiz de plantas de sorgo cultivadas no Cerrado goiano.

Agradecimentos

Ao fomento do Programa Institucional da Universidade Estadual de Goiás - UEG, e Campus de Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - CCET, pela bolsa em Pesquisa de Pós-graduação nível mestrado *Stricto Sensu* do Programa de Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT-CNPq) em Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo financiamento do projeto.

Referências

BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L. K.; GANNON, F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **Genome Research**, v. 1, n. 1, p. 51-56, 1991.

BITTENCOURT, C. I. L. **Diversidade molecular e fisiológica de *chromobacterium* sp. e outras bactérias isoladas de diferentes ecossistemas tropicais**. 2005. 85 f. Dissertação. (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

BOAKYE, E. Y.; LAWSON, I. Y. D.; DANSO, S. K. A.; OFFEI, S. K. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. **Symbiosis**, v. 69, pp 89 – 99, 2016.

DINGMAN, D. W. *Paenibacillus larvae* 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions: DNA fingerprinting and characterization. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 352-358, 2012.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Embrapa-CNPAB. Documentos, 110, Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, p.38, 1999.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol.** v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ACINAS, S. G.; ANTÓN, A. I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods** v. 36, p. 55 –64, 1999.

GURTLE, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v.142, p. 3-16, 1996.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. 1 ed. Brasília: Editora Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. EMBRAPA, 1994. 519p.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 945-952, 1993.

KRISHNAN, N.; GANDHI, K.; PEERAN, M. F.; KUPPUSAMI, P.; THIRUVENGADAM, R. Molecular characterization and in vitro evaluation of endophytic bacteria against major pathogens of rice. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 11, p. 800-813, 2015.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragments length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.58-63, 1994.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2 p. 155-161, 2005.

MASSOL-DEYA, A. A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F., & TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: KOWALCHUK, G. A.; DE BRUIJN, F.; HEAD, I. M.; VAN DER ZIJPP, A. J.; VAN ELSAS, J. D. (EDS.) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Springer Netherlands, 1995. 289-296 p.

NEIVERTH, W. **Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2012.

OLIVEIRA, M. S. **Caracterização bioquímica de bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro quanto a produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. 2016.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntrC (glnG) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 95-101, 1984.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAR intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.

REIS JÚNIOR, F. B., TEIXEIRA, K. D. S., REIS, V. M. **Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de brachiaria**. Documentos117, Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. 41p.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SILVA RODRIGUES, L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, n. 93, 1999. 58p.