

Caracterização da região intergênica 16S-23S rRNA de bactérias associativas de arroz (*Oryza sativa* L.)

Lucas Leonardo da Silva^{*1}(PG), Larissa Batista da Silva¹(PG), Enderson Petrônio de Brito Ferreira²(PQ), Karina Freire d'Eça Nogueira Santos¹(PQ), Plínio Lázaro Faleiro Naves¹(PQ), Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet¹(PQ).

¹Br 153, Nº 3105, Fazenda Barreiro do meio. Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas – CCET, Anápolis, GO – lucasleo.bio@gmail.com

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

Resumo: A região intergênica entre os genes 16S e 23S rRNA é considerada uma região variável do genoma bacteriano e tem sido utilizada para estimar a diversidade de microrganismos. O objetivo desse estudo foi caracterizar genotipicamente 22 bactérias associativas de arroz (*Oryza sativa* L.), pela análise da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) (IGS). A caracterização genotípica foi realizada pela técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos pHRf e p23Sr para avaliar a região IGS. Através da análise do perfil eletroforético dos produtos obtidos da PCR, foi observada a variação dos fragmentos de número, com 1 a 5, de tamanho entre 0,5 a 3 kpb. A maioria dos isolados de arroz avaliados apresentaram pelo menos três operons de rRNA. Pela análise do dendrograma foram identificados sete grupos com índice de similaridade de 50%. Foi observado que os isolados de arroz avaliados apresentam diversidade genotípica, já que quatro dos sete grupos apresentaram características únicas entre os isolados. Ainda, através dessa análise, foi possível identificar que apenas alguns isolados apresentaram uma relação estreita com a família *Rhizobiaceae*. Desse modo, a análise utilizando o gene marcador para região IGS permitiu observar a variabilidade genética presente em bactérias associadas a plantas de arroz cultivada no Cerrado.

Palavras-chave: Diversidade molecular. Bactérias promotoras de crescimento de plantas.

Caracterização genética. Genes ribossomais.

Introdução

Os microrganismos conhecidos como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP) ou *Plant-Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) constituem um diversificado e numeroso grupo de bactérias encontrado no solo e quando em associação com plantas, atuam direta e indiretamente no seu crescimento (PEDRINHO, 2009; GLICK, 2012).

Esse grupo de bactéria apresenta grande diversidade fenotípica e molecular e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas (PACE, 1997). Entretanto, apesar de sua importância, o número de espécies e grupos microbianos estudados e descritos representam apenas uma pequena porção da diversidade microbiana encontrada na natureza (OLIVEIRA et al. 2009).

Atualmente, estudos de diversidade e taxonomia microbiana adota uma análise polifásica usando dados morfológicos, bioquímicos e moleculares (IKEDA et al. 2013). Dentre esses, o uso de técnicas moleculares como a de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) utilizando o gene codificador do RNA ribossômico (rRNA) tem possibilitado o desenvolvimento de métodos simples e rápidos em estudos filogenéticos em procariotos (IKEDA, 2010; ORRILLO et al. 2015).

As bactérias possuem rRNAs 16S, 23S, 5S e as regiões espaçadoras intergênicas presentes entre os genes 16S-23S denominada de IGS (*intergenic spacer*). Essas regiões do genoma bacteriano são tidas como marcadores moleculares por serem universais e altamente conservadas (OLSON et al. 1994). Já foram identificados em diversas bactérias uma variação inter e intra específica para esta região IGS com variação de número e tamanho de fragmentos obtidos por PCR (BOAKYE et al. 2016). Assim, as informações obtidas através da análise e comparação desta região intergênica tem sido importantes na mensuração da diversidade genotípica e determinação taxonômica de bactérias RPCP (GARRITY e HOLL, 2001; REIS-JUNIOR et al. 2006; IKEDA, 2010; BOAKYE et al. 2016). Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi caracterizar genotipicamente, pela análise da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA), 22 bactérias associativas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado no Cerrado.

Material e Métodos

Material biológico: As bactérias utilizadas neste estudo foram isoladas de raízes de plantas de arroz cultivadas no bioma Cerrado segundo Ferreira et al. (2014). Para o estudo foram selecionadas 22 isolados e três estirpes de referência: *Rhizobium tropici* (BR322 e BR520) e *Azospirillum brasilense* (FP2).

Extração do DNA e análise da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA (IGS): A extração do DNA genômico dos isolados de arroz e das estirpes de referência foi realizada seguindo o método de Ausubel et al. (1999) adaptado segundo Oliveira (2016). A região IGS foi amplificada por reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos pHRf (5'-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3') e p23Sr (5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3') (MASSOL-DEYA et al. 1995). Para as condições de termociclagem foram estabelecidos os seguintes critérios: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos; 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 1

minuto), anelamento (62 °C por 45 segundos) e extensão (72 °C por 45 segundos); 1 ciclo de extensão final a 75 °C por 5 minutos, com o uso do termociclador Biocycler®. Posteriormente, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,3%, em tampão TBE 1x, a 90V, por 60 min. Os géis foram corados em brometo de etídio e os perfis de bandas formados comparados com o marcador de peso molecular 1Kb-DNA-Ladder.

Análise dos dados: Os resultados obtidos através da análise da região IGS foram convertidos em dados binários e utilizados para construção de uma matriz. A partir deste processo foi derivada uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J) para a construção do dendrograma, por intermédio do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmetic Means*), através do software NTSYS-pc® 2.10.

Resultados e Discussão

Os fragmentos obtidos a partir da PCR para região IGS dos 22 isolados de arroz e as estirpes de referência variaram entre 500 a 3000 pares de base (pb), com presença de 1 a 5 bandas. Foi possível observar que entre os isolados de arroz avaliados houve predomínio de bandas entre 500 a 1500 pb. Padrão semelhante foi observado por Lima (2013), em estudo realizado com 24 isolados associados ao milho, os fragmentos obtidos pelo autor apresentaram variação de tamanho entre 725 e 1100 pb.

Estudos têm demonstrado a variabilidade dessa região e a eficácia na caracterização genotípica dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e milho (QUEIROZ-RESPLANDES, 2016; OLIVEIRA, 2016). Segundo Boakye colaboradores (2016), a região IGS apresenta grande polimorfismo e perfil genotípico único para cada espécie bacteriana estudada, indicando ser uma região interessante para investigações da microbiota endofítica.

Baudoin e colaboradores (2010) e Jijón-Moreno e colaboradores (2015), observaram que estirpes de *A. brasilense* possuem múltiplas cópias de operons rRNA, constatando grande polimorfismo para região IGS entre os isolados dessa espécie. Os autores observaram não existir um perfil padrão para as diferentes estirpes de *A. brasilense* testada, entretanto, todas as cepas exibiram pelo menos três bandas principais. Para espécies bacterianas do gênero *Bradyrhizobium*,

Rhizobium e *Sinorhizobium* são descritos a presença de um a três cópias do operon (HAUKKA, 1997). Assim, pode-se inferir pelos dados obtidos que para a maioria dos isolados de arroz avaliados há a presença de pelo menos 3 operons de rRNA.

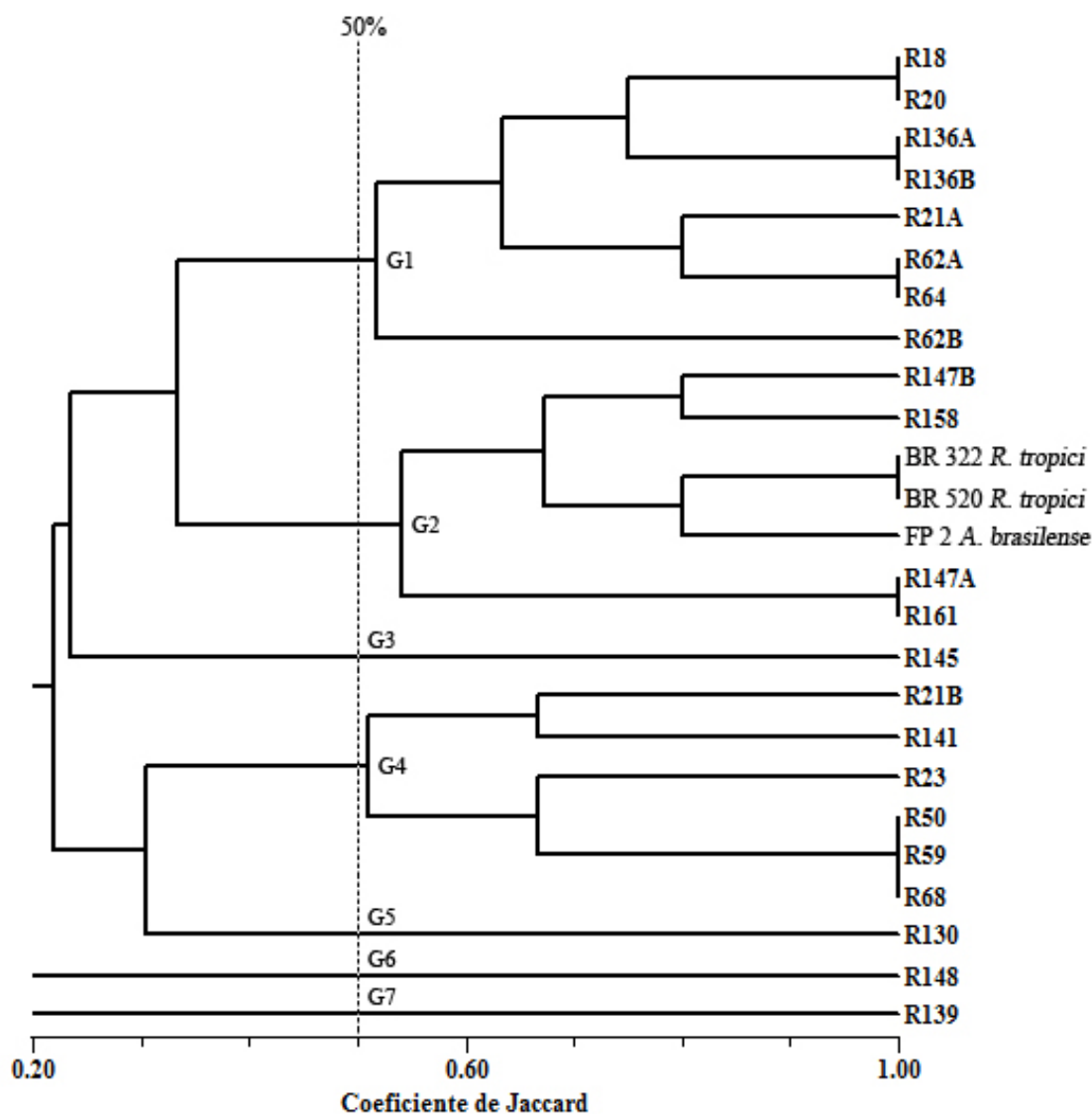
O dendrograma obtido pela PCR da IGS apresentou diversidade com a formação de sete grupos com 50% de similaridade (Figura 1). A presença de mais de um fragmento de tamanhos diferentes indicou a variabilidade da região espaçadora entre os isolados avaliados. Através da análise do dendrograma é possível supor que estes isolados de raízes de arroz apresentam diversidade genotípica, já que quatro dos sete grupos apresentaram características únicas entre os isolados como observado em G3 (R145), G5 (R130), G6 (R148) e G7 (R139) (Figura 1).

O maior agrupamento foi G1 formado por oito isolados (R18, R20, R136A, R136B, R21A, R62A, R64 e R62B) apresentou baixa similaridade (32%) com as estirpes de referência utilizadas no estudo (Figura 1). Entre os isolados houve a formação de três subgrupos no G1 com similaridade de 100% entre si. O primeiro subgrupo foi formado por isolados (R18 e R20) que apresentaram três fragmentos na PCR, variando entre 700 a 900 pb. O segundo (R136A e R136B) pela presença de fragmentos com variação entre 700 a 1300 pb. Para o ultimo subgrupo (R62A e R64) foi observado que o tamanho dos fragmentos variaram entre 700 a 2000 (Figura 1).

O grupo G2, foi formado por isolados com pelo menos quatro regiões IGS. O grupo foi composto pelas estirpes de referência, sendo os padrões para *R. tropici* (BR322 e BR520) com 100% de homologia entre si. A estirpe padrão para *A. brasilense* apresentou similaridade próxima a 70% com as estirpes BR322 e BR520. Os isolados R147A e R161 formaram um subgrupo com 100% de semelhança entre si, sendo observado quatro fragmentos variando entre 700 a 1100 pb (Figura 1).

Para G4 foi observado a formação de dois subgrupos formados isolados R21B, R141, R23, R50, R59 e R68, com similaridade próxima de 23% com as estirpes padrão em G2. Foi observada homologia próxima a 68% para os isolados formados no primeiro subgrupo em G2. O segundo foi formado por quatro isolados, sendo R50, R59 e R68 100% similar entre si (Figura 1).

Figura 2: Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base no perfil eletroforético da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) definido pelo algoritmo UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard. Foi estimado 50% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados.



Oliveira (2016), em estudo com rizóbios associados à planta de arroz observou a formação de oito grupos com similaridade de 50% para região IGS. Desses grupos, dois apresentaram características únicas e 43% dos isolados agruparam com 100% de homologia com três estirpes do gênero *Rhizobium* utilizadas como referência, sendo indicado que os isolados estudados pertençam ao grupo dos rizóbios. Resultado diferente do obtido no presente estudo, onde apenas 18% dos isolados apresentaram homologia entre 55% a 68% com as estirpes de

referência para *R. tropici*. Para os demais isolados foi observada similaridade inferior a 30%, indicando que essas bactérias possam pertencer a diferentes grupos taxonômicos.

Muitos autores têm demonstrando a eficácia na estimativa da diversidade bacteriana associadas a plantas de interesse agrícola, através da análises da região IGS (OLIVEIRA et al. 2012; DINESH et al. 2015). Isso é possível devido a diferenças no comprimento desta região que podem ser usadas para distinguir isolados bacterianos e espécies relacionadas taxonomicamente (REIS-JUNIOR et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2012; CARDOSO et al. 2017). Assim, esta estratégia de estudo para determinação da diversidade genética é um método simples e eficaz que permite distinguir espécies relacionadas filogeneticamente devido à elevada similaridade da região IGS.

Conclusão

Foi possível observar a variabilidade genética baseada no gene marcador para a região IGS dos 22 isolados avaliados. Estes dados indicam que estas bactérias, associadas a raiz de arroz cultivados no Cerrado, tem alta diversidade genética e que pode ser devido as pressões própria do ambiente.

Agradecimentos

Ao fomento fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), 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. A CCET/UEG Anápolis, GO

Referências

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4th Ed. New York: John Wiley and Sons, p. 1512, 1999.

BAUDOIN, E.; COUILLEROT, O.; SPAEPEN, S.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; NAZARET, S. Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phytostimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n.1, p 25-38, 2010.

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, p. 89-99, 2016.

CARDOSO, A. A.; ANDRAUS, M. P.; BORBA, T. C. O.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; FERREIRA, E. P. B. Characterization of rhizobia isolates obtained from nodules of wild genotypes of common bean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.48, p.43-50, 2017.

DINESH, R.; ANANDARAJ, M.; KUMAR, A.; BINI, Y. K.; SUBILA, K. P.; ARAVIND, R. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. **Microbiological Research**, v.173, p.34-43, 2015.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, v.30, n.3, p.655-665, May/June, 2014.

GARRITY, G. M. e HOLT, J. G. The Road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R. e CATENHOLZ, R.W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York, Springer-Verlag, v.1., p.119-166, 2001.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

HAUKKA, K.; LINDSTROM, M, K.; YOUNG, J. P. W. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.419-426, 1997.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.).**

2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, S.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V.

Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65: p.154-160, 2013.

JIJÓN-MORENO, S.; MARCOS-JIMÉNEZ, C.; PEDRAZA, R. O.; RAMÍREZ-MATA, A.; DE SALAMONE, I. G.; FERNÁNDEZ-SCAVINO, A.; VÁSQUEZ-HERNÁNDEZ, C. A.; SOTO-URZÚA, L.; BACA, B. E.; The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.107, n.6, p.1501-1517, 2015.

LIMA, D. S. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.).** 2013. 127 F. Dissertação (mestrado em química orgânica), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. **Bacterial community fingerprint of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA).** In: Akkermans ADL, Elsas JDV, Bruijn FJ (Ed.). Molecular microbial ecology manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M.; SILVEIRA, J. R. P.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B. Characterization of the spacer region 16-23S rDNA for differentiation of strains of rhizobia used in the production of commercial inoculants in Brazil. **Ciência Rural**, v.42, p.1423-1429, 2012.

OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. P.; SCOTTI, M. R.; ALVES, V. M. C. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1473-1482, 2009.

OLIVEIRA, M. S. **Caracterização bioquímica de bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro quanto a produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal**. 2015. 102 f. Dissertação (mestrado em ciências moleculares), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2016.

OLSON, R.; FORSBERG, H.; WISE, B.; RACK, J. Measurement of word recognition, orthographic, and phonological skills. In: G.R. Lyon (Ed.) **Frames of reference for the assessment of learning disabilities: New views on measurement issues**. Baltimore: Paul H. Brookes Publishing Co. p.243-277. 1994.

ORRILLO, E. O.; GARCIDUENAS, L. E. S.; ROGEL, M. A.; GONZÁLES, V.; PERALTA, H.; MORA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Taxonomy of Rhizobia and Agrobacteria from the *Rhizobiaceae* Family in Light of Genomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 287-291, 2015.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-40, 1997.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 74f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

QUEIROZ-RESPLANDES, V. M. **Caracterização genética e avaliação da produção de pigmentos tipo melanina de bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.)**. 2016. 107f. Dissertação (mestrado em Ciências Moleculares), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2016.

REIS-JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; SANTOS-TEIXEIRA, K. R. Restrição do 16S-23S
DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado
de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.431-438, 2006.