



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRUNA CAVALCANTE DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BACTERIOMA DE ARROZ  
VERMELHO**

**CAMPINA GRANDE - PB**

**2020**

**BRUNA CAVALCANTE DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BACTERIOMA DE ARROZ  
VERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Área de concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses**

**CAMPINA GRANDE - PB**

**2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237i Santos, Bruna Cavalcante dos.  
Identificação e caracterização do bacterioma de arroz vermelho [manuscrito] / Bruna Cavalcante dos Santos. - 2020.  
46 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2020.  
"Orientação : Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses, Coordenação do Curso de Ciências Agrárias - CCHA."  
1. Metagenoma bacteriano. 2. Oryza sativa L. 3. Bactérias endofíticas. 4. Melhoramento vegetal. I. Título  
21. ed. CDD 633.18

**BRUNA CAVALCANTE DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BACTERIOMA DE ARROZ  
VERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias/Área de concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal.

Aprovada em 11/06/2020

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr. German Andres Estrada Bonilla  
(Departamento de Microbiologia Agrícola - AGROSAVIA Colômbia)



---

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior (D.Sc. Agronomia)  
(Embrapa Semiárido; Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – UEPB)



---

Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (D.Sc. Biotecnologia Vegetal)  
(Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – UEPB)

**Dedico a meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram em tudo.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria das Dores Cavalcante e José Epitácio dos Santos, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio incondicional.

A minha avó Maria Joana Cavalcante, por ter me acolhido e me dado assistência. Ao meu avô Epitácio dos Santos (*In memoriam*) e minha madrinha Lúcia Maria Lira Lino (*In memoriam*), por todo o amparo e por sempre acreditar no meu potencial, muitas lembranças e saudades!

Aos meus irmãos, em especial a Buana pelo incentivo e ajuda na conclusão dos meus objetivos.

Ao meu orientador Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses, pela orientação, compreensão e paciência, seus ensinamentos foram de grande importância ao longo dessa caminhada.

A Banca examinadora, Dr. German Andres Estrada Bonilla e Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, pela disponibilidade e por aceitarem avaliar meu trabalho.

Aos meus colegas e amigos de curso, por toda força e auxílio direto ou indiretamente para que eu concluísse esse trabalho.

A todos os meus amigos que contribuíram para meu sucesso, agradeço imensamente pelas palavras de carinho e ânimo.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação, o meu **MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

SANTOS, C. Bruna. Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Março de 2020. Campina Grande, PB, 2020.p.51. **Identificação e caracterização do bacterioma de arroz vermelho.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

A interação íntima entre a planta e microrganismos associados é importante para determinar como funciona a promoção de maior tolerância a estresses abióticos e doenças. A identificação de perfis centrais em comunidades bacterianas promotoras desse crescimento, é baseada em amplicons e sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizados para caracterizar sua composição e diversidade. Contudo, a seleção de metodologia apropriada na condução de tais experiências é fundamental para reduzir erros e fazer comparações entre estudos e amostras. Este estudo identifica gêneros bacterianos mais encontrados em raízes e folhas de arroz vermelho, assim como faz um compilado de trabalhos com cultivares similares ao arroz, suas principais características e no desenvolvimento de plantas com valores agronômicos. A partir disso, foi visto que filos das Proteobactérias são mais abundantes, foram caracterizados gêneros distintos em folhas e raízes, mas também um conjunto, com representantes Firmutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Planctomicetes. presentes em ambas as partes que mostraram evidências na eficácia em serem BPCP.

**Palavras-Chave:** Metagenoma Bacteriano. *Oryza sativa* L.. Perfil Taxonômico. Sequenciamento de nova geração.

## ABSTRACT

SANTOS, C. Bruna. Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, march ,2020. Campina Grande, PB, 2020.p.51. **Identification and characterization of the red rice bacteriome.** Dissertation (Graduate Program in Agricultural Sciences). Adviser: Prof. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses, Ph.D.

The close interaction between the plant and the associated microorganisms is important to determine how the promotion of greater tolerance to stresses and abiotic diseases works. The identification of central profiles in bacterial communities that promote this growth is based on amplicons and sequencing of the 16S rRNA gene, used to characterize its composition and diversity. However, the selection of the appropriate methodology for carrying out such experiments is essential to reduce errors and make comparisons between studies and samples. This study identifies the bacterial genera most found in the roots and leaves of red rice, in addition to compiling works with cultivars similar to rice, their main characteristics and the development of plants with agronomic values. From that, it was observed that the phyla of Proteobacterias are more abundant, different genera were characterized in leaves and roots, but also a set, with representatives Firmutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia and Planctomicetes. present in both parties that showed evidence of their effectiveness in being BPCP.

**Keywords:** Bacterial Metagenome. *Oryza sativa* L.. Taxonomic Profiling. New Generation Sequencing

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análise qualitativa por espectrofotometria e análise quantitativa por fluorimetria, das amostras de DNA total.....	27
<b>Tabela 2.</b> Características das sequências. O número e sua porcentagem correspondente de 16S derivados de plantas e bactérias, bem como o comprimento médio em pares de base (pb).....	29
<b>Tabela 3.</b> Estimadores de riqueza e diversidade. O número de sequências observadas (Sobs) e a riqueza estimada (Chao, ACE), a diversidade (Simpson, Shannon e Número Efetivo de Espécies - NEE).....	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Partes da planta do arroz vermelho.....	15
<b>Figura 2.</b> Contraste de cor entre o arroz vermelho (esquerda) e o arroz branco (direita).	16
<b>Figura 3.</b> Mecanismos diretos e indiretos mediados por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) com efeitos benéficos nas plantas hospedeiras.....	18
<b>Figura 4.</b> Visão geral da interação entre plantas e bactérias endofíticas colonizando raízes e partes aéreas (folhas).....	19
<b>Figura 5.</b> Perfis moleculares dos amplicons com os oligonucleotídeos iniciadores 515F, 802R e 806R.....	28
<b>Figura 6.</b> Diversidade de Filos das OTUs detectadas nas amostras, de acordo com sua abundância relativa.....	30
<b>Figura 7.</b> Diversidade das OTUs detectadas nas amostras, sub-divisões do grupo Proteobacteria, de acordo com sua abundância relativa.....	31
<b>Figura 8.</b> Diversidade de filios das OTUs detectadas nas amostras, exceto as sub-divisões do grupo Proteobacterias, de acordo com sua abundância relativa.....	32
<b>Figura 9.</b> Diagrama de Venn mostrando os gêneros bacterianos compartilhados e únicos.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BPCP** - Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas

**NCBI** - National Center for Biotechnology Information

**OTU** – Do inglês “*operational taxonomic units*”

**PCR** – Do inglês “Reação em cadeia da polimerase

**PGPB** – Do inglês “*Plant Growth Promoting Bactéria*”

**pH** – Potencial hidrogeniônico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1. Geral.....	12
1.2. Específicos .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1. O arroz vermelho: Breve Histórico.....	14
2.2. Cultivo no Brasil e principais aspectos morfológicos do arroz vermelho .....	14
2.3. Interações planta-microrganismos .....	16
2.4. Bactérias Endofíticas .....	17
2.5. Diversidade em Microbiomas.....	19
2.6. Estudos de comunidades bacterianas.....	20
<b>3. MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1. Local de condução do experimento .....	21
3.2. Obtenção das amostras vegetais .....	22
3.3. Coleta das amostras .....	22
3.4. Análises das amostras.....	22
3.4.1. Esterilização superficial das amostras .....	22
3.4.2. Preparação das amostras.....	23
3.4.3. Extração e análise do DNA total .....	23
3.4.4. Avaliação da pureza e quantificação (PCR) da região 16S rRNA .....	24
3.4.5. Sequenciamento, em larga escala, dos genes 16S rRNA .....	25
3.4.6. Análises de diversidade e riqueza do Microbioma endofítico.....	25
3.4.7. Análises de Bioinformática .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
4.1. Análises de DNA Total .....	27
<b>4.2. Sequenciamento dos genes 16S rRNA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3. Diversidade, riqueza e perfil taxonômico</b> .....	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXO</b> .....	Erro! Indicador não definido.

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) em sua forma de grão possui um grande valor nutricional, contendo uma maior quantidade de ferro, cerca de três vezes mais que o branco, também é rico em proteínas, zinco, vitaminas e mais fibras presentes em sua casca, em comparação com o arroz branco (MAGALHAES, 2018). É considerada uma planta invasora nas regiões onde o arroz branco é cultivado, essa característica de planta daninha se deve pela grande capacidade de desenvolve-se nos mais diversos ambientes (SILVA, 2016).

Em escala nacional esse tipo de arroz ainda não é muito consumido se comparado ao arroz branco, sendo cultivado por pequenos agricultores. A maior produção se concentra na região Nordeste, mais especificamente no interior da Paraíba, tendo a maior produção de arroz vermelho do Brasil (EMATER, 2019). São, ao todo, cinco mil hectares, distribuídos entre os municípios de Itaporanga e Vale do Piancó, sendo de grande importância o desenvolvimento de técnicas mais modernas de cultivo desse cereal, já que as práticas agrícolas ainda são bem rudimentares (SOARES, 2014).

O aumento na procura por alimentos, e por alternativas de cultivos diferenciados, por consequência da população, junto com fatores de mudanças do clima global, são os principais desafios da agricultura do arroz, tendo que possibilitar maiores rendimentos por áreas de cultivo muitas vezes bem limitadas. Sendo a produtividade das plantas influenciada diretamente pela diversidade microbiana (BARBOSA, 2014).

A interação desse arroz com microrganismos endofíticos vem se mostrando muito viável e bastante positiva quanto em relação ao crescimento e desenvolvimento do mesmo, fatores como maior produtividade e principalmente maior rendimento mesmo em condições de déficit hídrico já é notado (FILGUEIRAS, 2019). Dentre esses microrganismos o que é abordado nesse trabalho são as bactérias endofíticas, que tem uma grande participação na colonização dos tecidos das plantas, promovendo um ambiente profícuo para a planta (HUREK, 2011).

Apesar de serem importantes para a estabilidade dos ecossistemas, pouco se sabe sobre a diversidade microbiana associada com arroz. A maioria dos estudos sobre biodiversidade microbiana nesse bioma foca na diversidade taxonômica e funcional de microrganismos do solo (BRUCE et al 2010). De uma maneira geral, o microbioma associado a plantas de arroz pode conter uma infinidade de microrganismos, em sua maioria desconhecidos, cujos papéis na manutenção da funcionalidade na planta não são totalmente conhecidos. Portanto, o estudo da

diversidade bacteriana é essencial para o conhecimento da distribuição de espécies e seus papéis funcionais, bem como para possíveis aplicações biotecnológicas (BARRETO, 2012).

O desenvolvimento de técnicas de sequenciamento em larga escala para a caracterização da estrutura de comunidade microbianas tem revolucionado os estudos sobre diversidade e ecologia de microrganismos, permitindo a maior cobertura das populações e a detecção de grupos pouco abundantes (ROESCH et al., 2010), bem como auxiliando na compreensão das interações ecológicas em comunidades microbianas complexas em diferentes ambientes (MENDES et al., 2014). Contudo, a maioria dos estudos realizados descrevem e comparam as estruturas das comunidades microbianas com base no número de filotipos encontrados em cada amostra ou na abundância relativa dos mesmos (BARBERÁN et al., 2012).

Mesmo com diversos trabalhos enfatizando as bactérias endofíticas em arroz, com o uso de técnicas baseadas em cultivos e concentrando, principalmente, as bactérias diazotróficas, ainda hoje é notado que há uma grande quantidade de bactérias que não são cultiváveis (HUREK, 2011). A utilização de técnicas que utilizam o gene 16S rRNA no estudo de microbiotas (como o sequenciamento, dentre outras) garantem uma melhor perspectiva sobre microbiomas relacionados às técnicas de identificação (SANTOS, 2018).

Dois dos sítios de localização destas bactérias são as folhas e raízes, estes por sua vez são bem distintos. Tal distinção pode fazer entender o motivo de alguns processos serem realizados em sua maioria por diferentes bactérias nestes locais endofíticos da planta (BRADER et al. 2014).

O entendimento e a exploração dos microbiomas são potencialmente benéficos às culturas e conseqüentemente a produtividade. Atualmente, estudos que forneçam embasamento voltado aos microrganismos que residem nos compartimentos relacionados à raiz do arroz, estão em sua grande maioria focados em conjunto com a área do solo (rizosfera), pesquisas sobre endófitos isolados de compartimentos tais como raízes e principalmente folhas tem sido muito estudadas. Diante do exposto, o presente trabalho apresenta a composição do bacterioma endofítico em raízes e folhas de arroz vermelho, utilizando técnicas com o gene 16S rRNA e de sequenciamento de nova geração em larga escala.

## **1.1. Geral**

Caracterizar a diversidade em bacteriomas endofíticos em folhas e raízes de arroz vermelho. Elencando quais gêneros são abundantes e trazem potenciais benefícios a planta.

## **1.2. Específicos**

Identificar os perfis taxonômicos bacterianos presentes distintamente, e em conjunto, nas folhas e raízes de arroz vermelho, determinando quais gêneros estão mais presentes nos tecidos foliares e radiculares.

Estimar índices de riqueza e diversidade pelo bacterioma endofítico das folhas e raízes de arroz vermelho e verificar quais dos mais presentes tem propensão a serem promotores de crescimento em plantas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. O arroz vermelho: Breve Histórico**

O arroz vermelho (*Oryza Sativa* L.) também conhecido como arroz da terra, de Veneza, arroz selvagem, sendo a forma espontânea da espécie. Compôs durante 200 anos a dieta dos brasileiros, onde foi introduzido pelos portugueses inicialmente no estado da Bahia, ainda no século XVI. Consecutivamente foi se incorporando no restante do Nordeste pelas várzeas do estado do Maranhão por meio dos açorianos no começo do século XVII (SILVA, 2017).

O Brasil já foi considerado o maior produtor desse cereal durante o império português. Só a partir do século XVIII, os portugueses trouxeram dos Estados Unidos um tipo diferente de arroz, o branco, que era considerado mais produtivo e rentável, fazendo com que esse fosse plantado por todo o território e obrigado a ser consumido, junto com e a proibição do consumo do arroz vermelho fez com que essa cultura fosse perdendo espaço com o tempo. (SLOW FOOD BRASIL, 2007).

Esse cereal ainda é cultivado principalmente no Semiárido nordestino, nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará, Bahia e Alagoas, onde são seus principais produtores, respectivamente (FILGUEIREDO, 2014). O plantio é normalmente realizado por pequenos agricultores, utilizando sementes nativas ou variedades tradicionais selecionadas ao longo do tempo, caracterizadas pela variabilidade, adaptabilidade às condições de cultivo e ampla base genética (BARRETO, 2012).

Por se tratar de uma cultura de grande adaptabilidade a solos com diferentes condições, passou de uma planta de solos alagados, considerada hidrófila, a uma cultura de grande potencial produtivo em condições até antes desfavoráveis, essa mudança é devido ao processo evolutivo da espécie, prosperando em diferentes condições de solo e clima, desenvolveu-se bem em áreas com baixa disponibilidade hídrica (MENEZES et al., 2012).

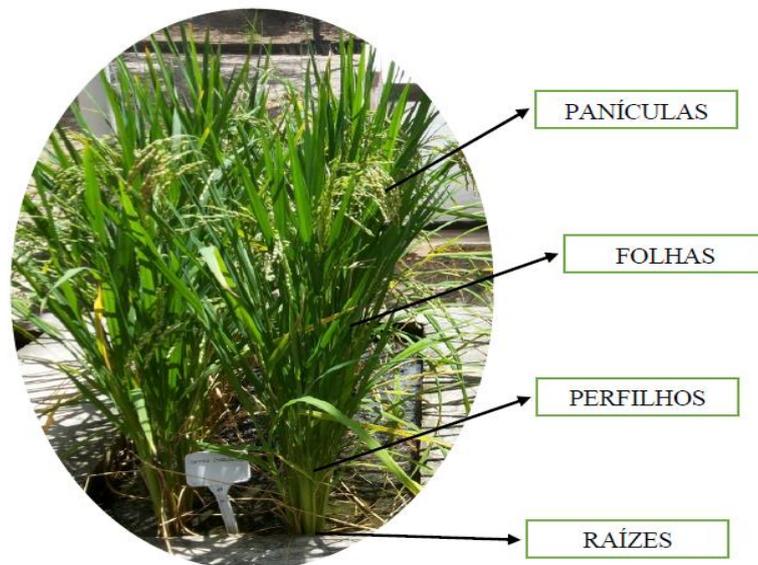
### **2.2. Cultivo no Brasil e principais aspectos morfológicos do arroz vermelho**

A produtividade do arroz vermelho é mais alta nos estados de Rio Grande do Norte e Paraíba, já nos estados do Ceará, Pernambuco Espírito Santo e Minas Gerais essa cultura é mais de subsistência, utilizando técnicas de cultivo mais tradicionais. A produção desse arroz

no país, em safras normais (ou seja, sem escassez de chuvas), é de cerca de dez mil toneladas (AGROEMDIA, 2018). As formas de cultivar o arroz são por dois sistemas: o de várzea (arroz alagado, irrigado por inundação), e o de terras altas (cultivado em condições de sequeiro dependente da água das chuvas ou irrigado por aspersão).

Esse tipo de arroz vem despertado o interesse de orizicultores do Sul e Sudeste, e de uma parte de consumidores que almejam novas experiências no que se refere à culinária. Ao longo dos anos houve modificações na produção deste cereal, onde foram desenvolvidas técnicas de melhoramento a partir de cruzamentos artificiais, realizados pelo programa de melhoramento genético de arroz da Embrapa. Foram oito longos anos de testes resultando na cultivar de BRS 901, sendo mais produtiva e mais resistente ao acamamento do que as outras cultivares, mostrando o potencial agrônômico desse cereal (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2018).

O arroz vermelho é uma poácea, monocotiledônea e se caracteriza morfológicamente por apresentar um grande porte, colmo fino, aristas longas, suas folhas são pilosas, decumbentes e de cor verde-clara, possuindo grande perfilhamento, tem em suas sementes um pericarpo de cor avermelhada graças à presença de um pigmento chamado proantocianina, que possui uma função antioxidante de importante valor na alimentação humana (BARBOSA et al., 2014) (Figura1).



**Figura1.** Partes da planta do arroz vermelho. SILVA, 2016.



**Figura 2.** Contraste de cor entre o arroz vermelho (esquerda) e o arroz branco (direita). SOARES, 2014.

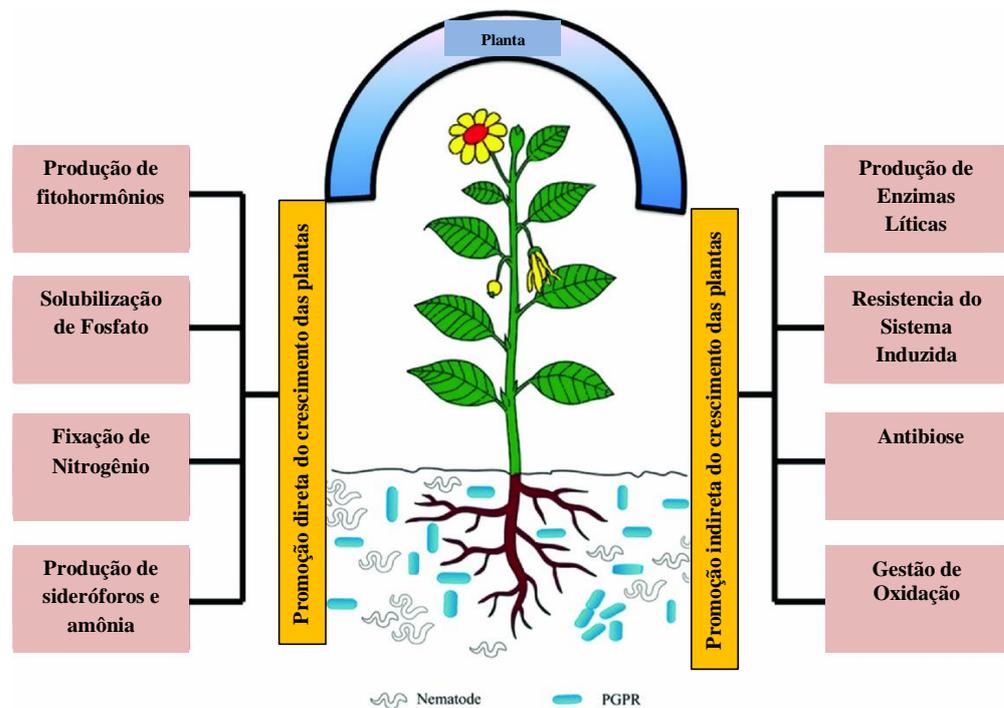
Apresenta uma grande fonte de carboidratos, fornecendo proteínas, vitaminas e minerais e possui um baixo teor lipídico. Seus aspectos fisiológicos como necessidade por água, luz e nutrientes são bem parecidos com o arroz branco, termos nutricionais o vermelho tem cerca de 3 vezes mais zinco, ferro e vitaminas que o branco (SOARES, 2014). A sua coloração característica, se dá pela presença de um pigmento originado das rotas metabólicas dos compostos fenólicos (Figura 2), uma substância responsável pela alta digestibilidade na alimentação humana, e pela ação antioxidante (MUKHERJEE et al., 2006).

Os indivíduos desta variedade de arroz, geralmente podem apresentar uma estrutura de planta tradicional (porte alto, folhas longas, largas e decumbentes) e um menor índice genético de produção. Entretanto, como fruto de cruzamentos naturais ao longo do tempo, já foram encontradas variedades de arroz vermelho estruturalmente similar a plantas modernas (porte baixo, folhas curtas, estreitas e eretas) além de uma melhora no potencial produtivo (SEVILLA et al., 2001). Com tudo isso, os processos de domesticação das plantas e sua manipulação ao longo dos anos, vêm trazendo resultados não só estruturais, mas também de interações com diversos tipos de microrganismos (KARRA et al., 2017).

### **2.3. Interações planta-microrganismos**

As interações entre planta-microrganismos podem ser classificadas de forma mais popular como benéficas (compatíveis) e como interações patogênicas (incompatíveis) (RODRIGUES et al., 2010). Nesse aspecto, estudos com propósito de estudar e entender essa relação tem se mostrado eficazes, tanto em relação à interação patogênica, na elucidação de problemas enfrentados pela agricultura, garantindo maior proteção e resistência contra pragas

e as adversidades climáticas, quanto na obtenção de cultivares adaptado a diversas regiões (BARZON, 2011). Já em relação às interações benéficas, os estudos estão focados principalmente em bactérias que podem promover o crescimento vegetal (também chamadas de PGPB) e onde já foram desenvolvidos importantes avanços. Tendo essas bactérias diferentes papéis nos mecanismos de promoção do crescimento, sendo estes classificados como mecanismos diretos (por exemplo, disponibilização de nutrientes e modulação dos níveis de fitohormônios); indiretos (produção de antibióticos, enzimas, sideróforos; competição por sítios de colonização; indução da resposta sistêmica) além de mitigar efeitos de estresses ambientais (efeitos abióticos) (BANERJEE, 2017) como mostrado na imagem abaixo (Figura 3).



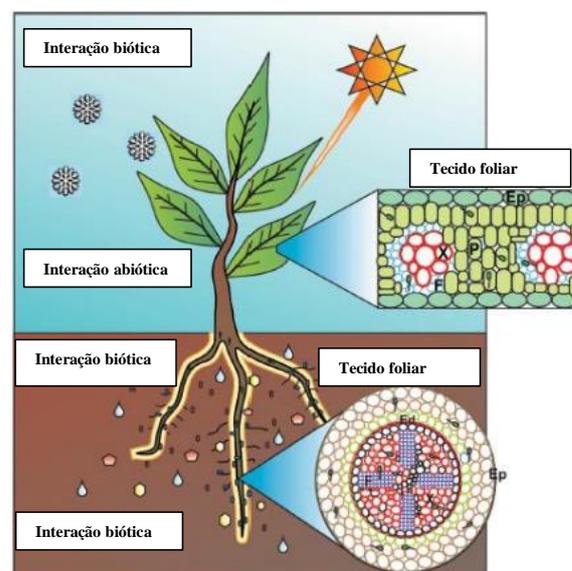
**Figura 3.** Mecanismos diretos e indiretos mediados por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) com efeitos benéficos nas plantas hospedeiras. Kumar e Singh, 2020 (adaptado).

## 2.4. Bactérias Endofíticas

Microrganismos endofíticos possuem em geral penetração passiva na planta, acessando o seu interior através de ferimentos, de sítios de emergência de raízes, coifa e estômatos nas folhas, espalhando-se pelos tecidos radiculares via apoplasto, colonizando os espaços intercelulares das células da hipoderme, córtex radicular e parede do aerênquima (OLIVARES et al., 1997; JAMES & OLIVARES, 1998).

Bactérias endofíticas por sua vez adentram, principalmente, no tecido da raiz, porém partes aéreas como flores, caules e cotilédones podem ser habitadas. Dentro da planta, essas elas podem se localizar num ponto central ou ficarem dispersas de forma sistêmica (BENTLEY et al., 2014). Logo, tem a capacidade de colonização dos tecidos internos das plantas não demonstrando sinal externo de infecção ou de efeito negativo nesses tecidos (BEDMAR, 2013). Isso se dá pela alta atividade enzimática que apresentam, enzimas como celulases e pectinases; contudo, podendo penetrar também quando ocorrem algumas injúrias causadas por causas naturais.

No que se referem à ecologia, os endófitos podem ser comensais, quando geralmente trazem efeitos neutros para a planta; os benéficos, quando trazem algo atrativo e vantajoso às plantas contra patógenos ou até contra a herbivoria, e os oportunistas ou latentes demonstrando efeitos prejudiciais algumas condições (KARRA et al. 2017). Entre esses endófitos, os endófitos benéficos são vistos como um novo viés a prospecção de agentes de biocontrole e biofertilizantes, aumentando a produtividade das culturas. Deste modo a forma que eles colonizam as diferentes partes da planta, conferem diferentes mecanismos e conseqüentemente diferentes produtos metabólicos, a seguir, a imagem abaixo exemplifica esse processo de colonização (Figura 4).



**Figura 4.** Visão geral da interação entre plantas e bactérias endofíticas colonizando raízes e partes aéreas (folhas). Carvalho et al. (2016) (adaptado).

Recentemente graças aos estudos cada vez mais aprimorados em manipulação das comunidades endofíticas presentes em muitas espécies de plantas, está sendo elucidado seu efeito benéfico por meio do isolamento, cultivo e triagem funcional em associação as culturas

vegetais (SOUSSEI et al., 2016). Logo, começam a ter evidência certas estirpes, que se destacam e passam a ter potencial na prospecção de inoculantes microbianos (BENEDUZI et al., 2013). Dentre os grupos estão *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* e *Pantoea* (CAPORASO et al., 2010). Podendo substituir fertilizantes químicos e pesticidas, apresentando uma via sustentável e de menor custo (BENEDUZI et al., 2013).

## 2.5. Diversidade em Microbiomas

Um microbioma pode ser entendido como o conjunto de microrganismos (bactérias e fungos) e dos seus genes formando um conjunto de genoma que habitam um determinado local. Logo, atribuído a esse trabalho, o microbioma estudado foi o bacteriano (bacterioma), que é um dos mais pesquisados. Microbiomas de arroz já vêm ganhando maior visibilidade, com os trabalhos de LEE et al. (2013) onde exploram a capacidade de promoção de crescimento vegetal desta cultura e algumas outras culturas semelhantes a ela, podendo chegar a um conjunto de microrganismos, encontradas em culturas distintas, mas de grande importância para a agricultura (CHO, et al., 2017).

Esses microbiomas estão presentes tanto em partes externas quanto internas, neste caso, o microbioma endofítico se refere ao conjunto dos microrganismos que habitam o interior do hospedeiro sem causar danos ou sintomas aparentes, em relações mutualísticas ou comensais, podendo haver casos de serem considerados patógenos latentes, mas se diferenciando dos fitopatógenos reais, por não causarem prejuízos severos e doenças às plantas, pois esses quando causam alguma anomalia na planta, se dá por modificações nas condições do ambiente ou de caráter fisiológico do próprio hospedeiro (MAGNANI et al., 2013).

O microbioma endofítico associado às plantas está ligado principalmente a fatores bióticos e abióticos, como temperatura, pH, salinidade, umidade, interação com outros seres vivos, características genéticas e a disponibilidade de nutrientes, levando em consideração a diversidade da comunidade microbiana em espécies cultivadas e selvagens (CHEN et al., 2015). O microbioma do arroz pode ser estudado minuciosamente de acordo com os compartimentos onde residem essas comunidades microbianas. Entre os compartimentos, o sistema radicular (rizosfera e endosfera radicular) é mais investigado do que outros compartimentos (MAGNANI et al., 2013). Algumas análises em relação às partes aéreas (filosfera e semente) também são feitas com abordagens dependentes do meio de cultura e independentes (LI et al., 2013).

Os microrganismos associados a uma planta tem potencial para melhorar a produtividade e a sustentabilidade das culturas. Apesar da necessidade de microbiomas aplicáveis à agricultura, estudos de microbiomas vegetais foram conduzidos em plantas não cultivadas devido à relativa facilidade da pesquisa. No entanto, para tornar os microbiomas vegetais úteis para a agricultura é necessário um modelo baseado em plantas cultiváveis (LUVIZOTTO et al., 2010). Paralelamente, partes negligenciadas de microbiomas que não sejam a pesquisa centrada em bactérias precisam ser consideradas para expandir nossos conhecimentos sobre a microbiota ao nível do ecossistema.

A composição microbiana fornece funções específicas de cada estágio vegetal. Alguns grupos taxonômicos foram identificados em estudos com plantas de arroz, milho, soja e cana-de-açúcar onde estão associados a processos de fixação biológica de nitrogênio, auxílio na produção de fitormônios, solubilização de fósforo e aceleração dos processos de mineralização. Dentro do grupo das  $\alpha$ -Proteobacteria, as mais relatadas são: *Azospirillum sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Rhizobium leguminosarum* (SILVA et al., 2016).

No que se refere às  $\beta$ -Proteobacterias, existe as *Burkholderia sp.*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisulbalbicans* são tidas como as principais. E nas  $\gamma$ -Proteobacteria: *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*. Alguns representantes de outros grupos como *Clostridium* e *Staphylococcus saprophyticus* demonstram possuir algumas estirpes endofíticas. Para o táxon *Actinobacteria* sendo endofíticas: *Curtobacterium sp.*, *Mycobacterium sp.* e *Streptomices* (MAGNANI et al., 2013).

## 2.6. Estudos de comunidades bacterianas

A utilização dessas técnicas tem possibilitado o conhecimento da composição da comunidade microbiana, por meio do sequenciamento de regiões hipervariáveis do gene 16S RNAr de bactérias garantindo uma grande quantidade de genes presentes nas comunidades microbianas, com a realização do sequenciamento do DNA total, extraído o que chamamos de metagenomas. (MAREQUE et al., 2014).

Poder identificar as bactérias presentes no microbioma, e posteriormente caracterizá-las é de grande importância, pois passamos a entender mais sobre a dinâmica nas relações entre os microrganismos e também como a relação entre microbiota e hospedeiro ocorre (MAROPOLA et al., 2015). No que se referem a estudos genômicos, duas abordagens de estudo de

comunidades microbianas podem ser adotadas, utilizando-se as novas tecnologias de sequenciamento (NIKOLIC et al., 2011). A primeira se refere a análise de amplicons do gene 16S RNAr, onde uma ou mais regiões hipervariáveis do gene 16S RNAr de membros individuais da comunidade é amplificada, por meio de PCR, usando iniciadores complementares a regiões conservadas do gene, flanqueando as regiões hipervariáveis e sequenciada, fazendo depois a comparação das sequências com aquelas depositadas em bancos de dados existentes, classificação e cálculo da abundância e riqueza relativa (MAGNANI, 2013).

A segunda, por meio do sequenciamento em larga escala do DNA extraído de toda a comunidade microbiana de algum tecido específico, permitindo assim a identificação e composição do microbioma, assim como diversidade da comunidade bacteriana (REUTER, 2015). Tendo o sequenciamento de amplicons do gene 16S RNAr um formato mais acessível e utilizada em estudos que visam à identificação de membros de uma comunidade microbiana, sendo considerado um bom marcador na caracterização taxonômica (SALONEN et al., 2010).

Alguns estudos relatados por TAUPP et al. (2011), demonstram essa abordagem metagenômica na identificação taxonômica e/ou de genes e compostos com ação inseticida, e genes de resistência a herbicidas, para utilização no controle de pragas em sistemas agrícolas. O aparecimento dessas tecnologias de sequenciamento em larga escala, chamadas de next-generation sequencing (sequenciamento de nova geração), vem dando a possibilidade de ampliar ainda mais o entendimento sobre microbiomas, com o uso de técnicas como clonagem dos genes 16S rRNA. BULGARELLI et al. (2012), por exemplo, utilizaram esta abordagem com *Arabidopsis thaliana* onde faz a comparação da estrutura do microbioma presente em raízes e WILSON et al. (2013), que aborda tanto a composição, estrutura quanto o perfil funcional do microbioma foliar do arroz, sendo de interesse desse trabalho comparar junto à parte de composição.

### **3. MATERIAIS E METODOS**

#### **3.1. Local de condução do experimento**

Foi realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), localizado no município de Campina Grande, PB.

### **3.2. Obtenção das amostras vegetais**

As amostras utilizadas nesse experimento advêm de um experimento anteriormente realizado em 2018 na cidade de Santana dos Garrotes- PB. As coordenadas geográficas do município são latitude: 7° 23' 14" e longitude: 37° 58' 20". O local de coleta foi a Comunidade Aroeiras do município de Santana dos Garrotes-PB, onde há a maior concentração de produtores, sabendo-se que no Vale do Piancó, vários municípios cultivam o arroz. Feito em plantio comercial. Foram utilizadas folhas e raízes de arroz vermelho (Genótipo 405 Embrapa) da Embrapa Meio Norte.

### **3.3. Coleta das amostras**

Sendo objetos de estudo, amostras de folhas e raízes de arroz vermelho, coletadas em condição de estiagem (outubro a dezembro de 2018). A coleta dos materiais biológicos foi realizada em cinco locais diferentes dentro de um arrozal, constituída de nove plantas (em conjunto), com três repetições para cada tecido analisado. Foram coletadas três amostras foliares e três amostras radiculares por exemplares, com auxílio de luvas, tesoura e envolvidas em papel alumínio, em seguida, identificadas e armazenadas em nitrogênio líquido e imediatamente levadas ao laboratório.

### **3.4. Análises das amostras**

#### **3.4.1. Esterilização superficial das amostras**

As amostras de folhas passaram primeiramente por uma desinfestação com álcool a 70% (30 segundos) e hipoclorito de sódio a 2% (30 segundos); e as raízes lavadas, descascadas e desinfestadas superficialmente por imersão em etanol 95% seguida de flambagem, por três vezes, devolvendo as amostras para um recipiente estéril em banho de gelo. Além disso, neste ponto do tempo, as plantas tiveram a sua superfície radicular desinfestada com cloramina-T (Sigma, Cat. No. 857319) a 1% (m/v) por 2 min antes de maceração.

Em seguida todas as amostras passaram pelo processo de lavagem com água destilada autoclavada durante 30 segundos, sendo a lavagem realizada duas vezes. Para a comprovação da eficiência da esterilização superficial das amostras deste material, três amostras foram expostas e repousadas em meio DYGS (RODRIGUES et al., 2009) suplementado com 2,5% de caldo de cana-de-açúcar esterilizado por filtração, e incubando esta placa por uma semana a 30 °C para enriquecimento do meio de cultivo.

### **3.4.2. Preparação das amostras**

As amostras foram colocadas em tubos Falcon de 50 ml (esterilizados) com 15 mL de tampão PBS (por 1 litro: 8 g de NaCl, 0,2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ajustado para pH 7,4 usando HCl). Os tubos foram agitados no Vortex por 2 min para remover os microrganismos que ficaram aderentes e então o extrato líquido decantado foi coletado. Sendo feitas três sonificações por 1 min, cada uma com 15 mL de Tampão PBS usando a sonda de sonicação (Microson Ultrasonic Cell Modelo de disruptor XL2000, Misonix Incorporated, Nova Iorque) para remoção de microrganismos aderentes que não são de interesse.

### **3.4.3. Extração e análise do DNA total**

A extração do DNA total foi realizada seguindo o protocolo descrito por Virupakshi (2007). Às amostras, foram adicionados SDS 10%, 10 mg mL<sup>-1</sup> de proteinase K e 10 mg mL<sup>-1</sup> de RNase A e maceradas; homogeneizando bem e incubando o sistema de digestão por uma hora ou durante a noite a 37 °C.

Houve a adição de 1 volume de fenol equilibrado, centrifugando por 5 min a 4 °C em velocidade máxima. O sobrenadante foi coletado e levado a um novo tubo, onde foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 5 M, passando por uma nova extração com 1 volume de clorofórmio : álcool isoamílico 24:1 (v/v), centrifugando novamente por 5 min a 4 °C em velocidade máxima. Coletou-se o sobrenadante mais uma vez para coloca-lo em um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol anidro gelado e incubação a 0 °C por 1 hora ou mais.

Com a conclusão da precipitação, o mesmo foi centrifugado por 30 min a 0 °C em velocidade máxima (~16.000 x g), desprezado sobrenadante e lavando-se o sedimento com etanol 70 %, e centrifugado novamente por 5 min na velocidade máxima a 0 °C. O sobrenadante foi descartado no término e o sedimento formado foi seco. Após estar bem seco, o sedimento

foi redissolvido em tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA-Na<sub>2</sub>), transferindo então a solução para um novo microtubo. Ao final de tudo secou-se o sedimento de DNA passando por ressuspensão em tampão.

#### 3.4.4. Avaliação da pureza e quantificação (PCR) da região 16S rRNA

O DNA extraído foi utilizado como modelo para a primeira amplificação da região variável V4 do 16S rRNA por PCR usando os iniciadores V4 [515F (CAGGACCAGGGTACGGTGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA), 802R (CGCAGAGAGGCTCCGTGTACNVGGGTATCTAATCC) e 806R (CGCAGAGAGGCTCCGTGGACTACHVGGGTWTCTAAT)] (Caporaso et al., 2012) com duas sequências ricas em GC diferentes, permitindo barcoding com uma segunda da amplificação. Cada amostra foi amplificada em triplicado em 20 µL de reação em volume contendo 8 µL de HotMasterMix 5Prime (Quanta Bio, EUA), 0,4 µL de BSA 20X, 1 µL de EvaGreen™ 20X (Biotium, EUA), 0,5 µL de iniciador 515F (10 µM modificado), 0,25 µL de iniciador 802R (10 µM modificado), 0,25 µL de iniciador 806R (10 µM modificado), 0,5 µL de iniciador de bloqueio mitocondrial V4 MitoBlk\_515F (TCCCCATGCTTTTCGCACCCCA/3SpC3/) (100 µM), 0,5 µL de V4 ChloBlk\_806R (GTCTCTAATCCCATTTGCTCC/3SpC3/) iniciador de bloqueio de cloroplasto (100 µM e 2 µL (10-50 ng) do modelo de DNA.

As amplificações por PCR foram realizadas com o sistema StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA) com 34 ciclos de 94 °C por 20 s, 52 °C por 20 s, 65 °C por 40 s e uma extensão final de 65 °C por 2 minutos. A amplificação primária aproveita os primers V4 mitocondriais e cloroplasticos bloqueadores específicos do arroz para aumentar a amplificação das sequências procarióticas. A água foi usada nos controles negativos. Para a segunda amplificação de PCR foi necessária para anexar os barcoding e foi realizada usando um primer direto com o adaptador (um barcoding de 10 bp específico da amostra e a cauda dos primers primários do PCR) e um primer reverso com a sequência do adaptador e a cauda reversa. A reação foi realizada em volume de 25 µL contendo 10 µL de HotMasterMix 5Prime, 1,25 µL de EvaGreen™ 20X, 1,5 µL de iniciador com barcoding (10 µM), 1 µL do primeiro produto de PCR com as seguintes condições: 8 ciclos de 94 °C por 10 s, 60 °C por 10 s, 65 °C por 40 s e uma extensão final de 72 °C por 3 min.

Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose não-desnaturante a 1%. Os fragmentos no gel foram marcados com solução de brometo de etídio a 10 mg mL<sup>-1</sup> e em seguida visualizado a transiluminação UV utilizando o fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

Os amplicons relacionados ao DNA de bactérias produzidos na PCR dos genes 16S rRNA usando os iniciadores 515F, 802R e 806R foram excisados do gel de agarose e purificados utilizando o kit de purificação de DNA de gel de agarose, conforme o recomendado pelo fabricante. Os fragmentos purificados foram verificados quanto a sua integridade em um gel de agarose não-desnaturante à 1 %, marcando-os e visualizando-os pelo Qubit 4.

#### **3.4.5. Sequenciamento, em larga escala, dos genes 16S rRNA**

Os produtos de PCR bacteriano foram enviados para o sequenciamento na Wemseq Pesquisa e Desenvolvimento LTDA (Curitiba – Brasil), seguindo parâmetros de sequenciamento em larga escala dos genes 16s rRNA.

Em seguida os produtos de PCR foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq em pair-ends. Posteriormente passaram por um processo onde foram montados contigs a partir dos reads forward e reverse (pair-ends) e as sequencias contíguas foram alinhadas utilizando o banco de dados SILVA SEED v119 (disponível em <https://www.mothur.org>) como arquivo de referência. Sequencias ambíguas, quiméricas e maiores que 275 pb foram removidas. Para esta análise foi utilizando o banco de dados SILVA SEED v123 como arquivo de referência, e removendo-se sequencias irrelevantes para a análise (cloroplastos, mitocôndria e de eucarioto)

Apenas as sequencias de alta qualidade e normalizadas foram utilizadas para a classificação taxonômica, construção dos gráficos de rarefação e os cálculos dos índices de diversidade (SHANNON, 1949; SIMPSON, 1949) e riqueza (XIAO, 2012). As sequencias representativas de cada OTU foram submetidas a classificação de gêneros, baseadas em comparação com o banco de dados SILVA SEED. Além de pesquisa bibliográfica a respeito da importância agrobiotecnológica dos gêneros das OTUs apresentadas neste trabalho.

#### **3.4.6. Análises de diversidade e riqueza do Microbioma endofítico**

Uma compilação de dados para definir o grupo de gêneros bacterianos endofíticos, os mais abundantes, foi realizada utilizando uma busca na literatura por dados de gêneros de

bactérias endofíticas, a partir de tecidos radiculares e foliar, sendo esses superficialmente-desinfestados e caracterizados através do sequenciamento do gene 16S rRNA, de trabalhos dos últimos anos (BULGARELLI et al., 2012; SHAW et al., 2015; SILVA et al., 2010; HUNGRIA THOMAS et al., 2012) foi realizado para serem compilados juntamente com os dados deste presente trabalho, com a fim de estabelecer um grupo de gêneros mais presentes. O critério de definição foi selecionar os gêneros com frequência  $\geq 3$  De gêneros encontrados por amostras dos dados compilados.

#### **3.4.7. Análises de Bioinformática**

Os dados do sequenciamento foram analisados utilizando o software Mothur v1.39.3 (ZHANG et al., 2011), passando pelos processos onde foram montados contigs a partir dos reads forward e reverse (pair-ends), as contigs foram alinhadas com o uso do banco de dados SILVA SEED v119 (disponível em <https://www.mothur.org>).

Para analisar a presença de táxons distintos e relacionados, feita a interpretação por diagrama de Venn das atribuições taxonômicas totais, foram construídos usando a função `draw.quad.venn` do Ven-Pacote Diagram v1.6.20 (TIMP, 2010). Desta forma sendo explorada a de distinção dos compartimentos de arroz. Sendo agrupados e atribuídos usando o *complete*, do comando *hclust*. A diversidade das partes foi analisada com o índice de diversidade de Shannon (H,) usando uma estimativa junto ao comando da diversidade como parte do pacote Vegan-Oksanen, 2015.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSAO

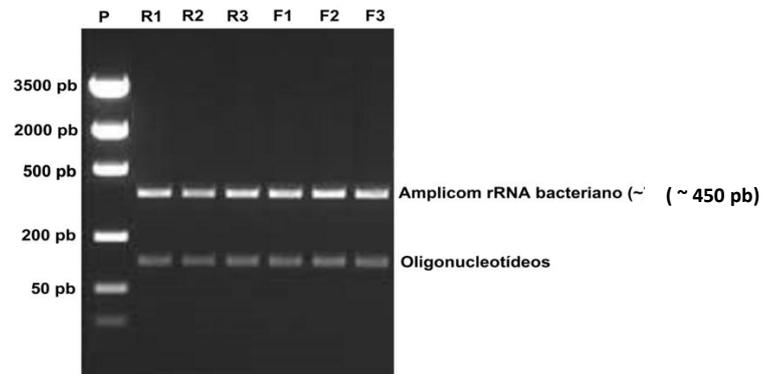
### 4.1. Análises de DNA Total

Após a extração do DNA total das três amostras de cada tecido estudado, descritas neste trabalho, foram avaliadas quantitativamente e qualitativamente por fluorimetria, obtendo uma média de ~101,26 ng para raízes e ~ 100,53ng para folhas. Mantendo as razões de absorvância dentro do padrão (máxima de 260nm), as amostras de raízes e folhas ficaram entre ~1.8 – 2.2, e para absorvância em 260/280 entre ~1,8 – 2.2 indicando o mínimo de interferência de proteínas, sais ou outros de contaminantes oriundos do processo de extração, demonstrando a pureza do material analisado. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise qualitativa por espectrofotometria e análise quantitativa por fluorimetria, das amostras de DNA total.

Tecido	Amostras	Razões de absorvância		Massa Total (ng)
		260/230	260/280	Qubit
Raízes	R1	1,97	1,83	101,4
	R2	2,01	1,91	99,8
	R3	1,92	1,88	102,6
Folhas	F1	1,88	1,85	97,7
	F2	2,00	1,90	100,5
	F3	1,99	1,87	103,4

Com a PCR foi obtido a presença do DNA bacteriano nas amostras de DNA total, com os iniciadores 515F, 802R e 806R, foi possível identificar a predominância do DNA bacteriano em referencia a planta, isso devido aos bloqueadores para DNA mitocondrial e cloroplastico. A primeira faixa concentrada entre 500 e 200pb representa o perfil bacteriano, indicando que amplificons de mitocôndrias e bactérias resultam em fragmentos de composição e tamanhos diferentes (Figura 5).



**Figura 5.** Perfis moleculares dos amplicons com os oligonucleotídeos iniciadores 515F, 802R e 806R.

Nessa perspectiva foi utilizada a técnica de PCR que conseguem fazer a distinção do DNA vegetal do bacteriano por meio dos amplicons de tamanhos diferentes (SUN et al., 2008). Isso garante com que não seja necessário o cultivo das bactérias para se identificar em quais grupos estão presentes. Essa técnica pode ocasionar baixa quantidade do genoma bacteriano, e conseqüentemente em erros no mapeamento (Zhang et al., 2011).

A Polimerase Phi29 é usada em pesquisas atuais na tentativa de resolver esse empecilho da baixa quantidade, sendo possível a ampliação genômica mais efetiva (SOLOVYEV, et al., 2011). Ainda existem dúvidas em relação à interferência que a ampliação exerce no microbioma, implicando em mais estudos sobre a legitimação no estudo de metagenomas (SHAW, 2015). Contudo, a técnica mostrou-se muito satisfatória para o objetivo proposto, foram identificados grupos bacterianos em nível de gêneros com capacidade de habitar em locais distintos e simultâneos em arroz e que possuem função de BPCP.

#### 4.2. Sequenciamento dos genes 16S rRNA

Obtido no total de 119.194 reads bacterianas, tendo maior percentual encontrado nas raízes (> 99%), 110 pertencentes a planta, com maior concentração nas folhas. Após a etapa de filtragem por qualidade e montagem de contigs das sequências, ~60.000 reads foram classificados como sendo de alta qualidade. Apenas 5% dessas sequências se tratavam de quimeras.

**Tabela 2.** Características das sequências. O número e sua porcentagem correspondente de 16S derivados de plantas e bactérias, bem como o comprimento médio em pares de base (pb).

Amostras	Reads vegetais		Reads bacterianas		Tamanho médio (pb)
	número	porcentagem	número	porcentagem	
<b>Raízes</b>	40	0,06	61.327	99,94	450
<b>Folhas</b>	70	0,12	57.867	99,88	

\* Resultados para o perfil taxonômico baseado em 16S dos dois tecidos.

Como o centro deste trabalho foi a identificação do microbioma em compartimentos de arroz, foi preciso uma identificação de um microbioma central/geral até chegar num conjunto específico a fim de montar um perfil de identificação. No entanto, independente da estimativa de riqueza observada nos compartimentos cada parte estudada teve presença de gêneros entre si e distintamente. A microbiota endofítica está em baixo número em relação à microbiota do solo ou da rizosfera, e a quantidade de células vegetais (BULGARELLI et al., 2012), logo, fez-se necessário uma técnica de distinção aprimorada destas bactérias endofíticas, para que seja evitado um excesso de presença de DNA vegetal (mitocondrial, plastidial e nuclear) (GRANGEASSE et al., 2012).

#### 4.3. Diversidade, riqueza e perfil taxonômico

Os índices de diversidade e riqueza (Tabela 3) revelaram que as amostras foram ricas e diversas em OTUs. Para as amostras de raízes houve maior homogeneidade em relação às de folhas (índice de Simpson), enquanto que para as folhas. Demonstrando que para as amostras de raízes a diversidade foi maior.

**Tabela 3.** Estimadores de riqueza e diversidade. O número de sequências observadas (Sobs) e a riqueza estimada (Chao, ACE), a diversidade (Simpson, Shannon e Número Efetivo de Espécies – NEE).

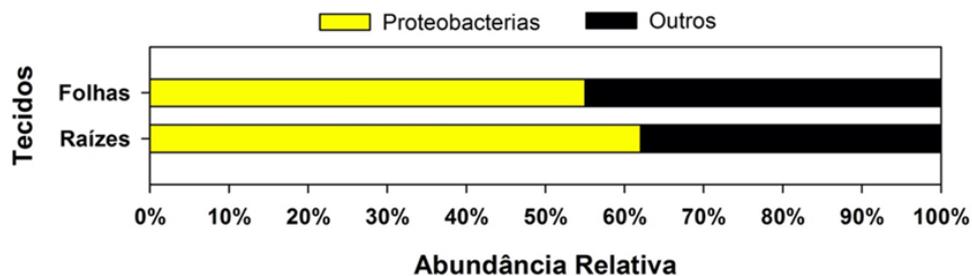
	Estimador de Riqueza			Estimador de Diversidade		
	S <sub>obs</sub>	Chao	ACE	Simpson	Shannon	NEE
<b>Raízes</b>	1248	1376,7	1333,1	0,071	3,76	66
<b>Folhas</b>	894	947,2	959,6	0,066	2,98	55

\*Os valores dos limites do intervalo de confiança de 97 % estão representados entre parênteses.

Os índices estimadores de riqueza e diversidade utilizados neste trabalho (Tabela 3) demonstraram que o estimador Chao que denomina se uma comunidade está sendo amostrada

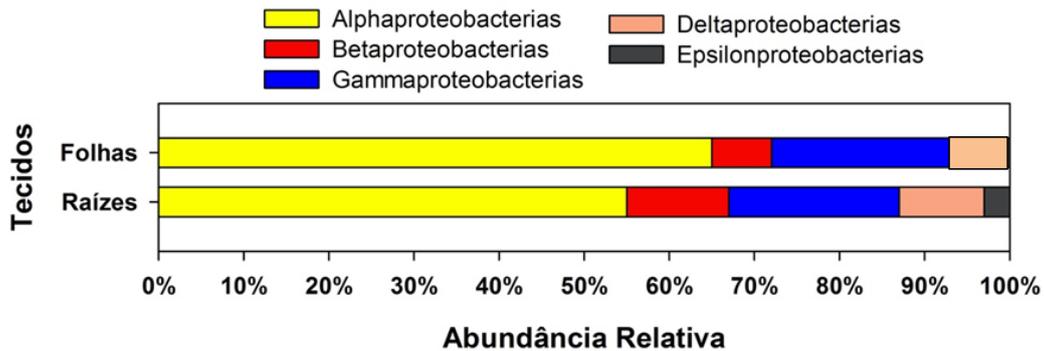
e espécies raras ainda estão sendo descobertas, podendo haver espécies mais raras não encontradas (CHAO, 2012), os valores estimados maiores do que os observados. O índice de diversidade Simpson, mostra a probabilidade de dois indivíduos selecionados ao acaso em uma amostra ser pertencente à mesma espécie. Neste aspecto, existe um grau de incerteza em classificar a espécie que um grupo pertence, logo, quanto maior for essa incerteza, maior será o valor e maior será a diversidade da amostra (SHANNON, 1949).

Foram detectadas no total 88 gêneros, revelando a predominância de membros das Proteobacterias, com ~63% para amostras de tecidos radiculares e ~55 % para foliares, pertencentes principalmente as Alfa-, Beta- e Gammaproteobacteria, tendo uma maior representatividade da Alfa em amostras de folhas e das Beta em raízes (Figura 6).



**Figura 6.** Diversidade de Filos das OTUs detectadas nas amostras, de acordo com sua abundância relativa.

Embora tanto raiz quanto folhas tenham apresentado maior presença de Alphaproteobacterias, em termos de percentual, as folhas tiveram maior quantidade (67%), seguido das Gammaproteobacterias (22%). Enquanto que, nas raízes, tiveram uma maior representatividade comparado as folhas, o grupo das Betaproteobacterias (2x maior). Outras classes como as Deltaproteobacterias e Epsilonproteobacterias estavam nas duas áreas, em percentuais menores (Figura 7).

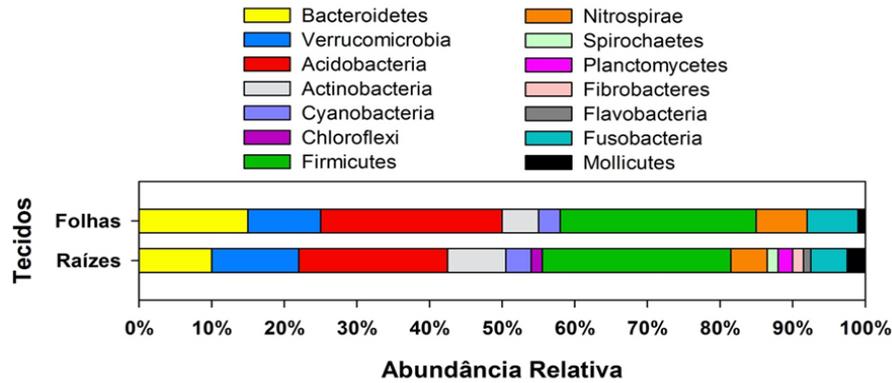


**Figura 7.** Diversidade das OTUs detectadas nas amostras, grupo Proteobacterias de acordo com sua abundância relativa.

Dentre os filos encontrados, o das Proteobacterias foi o que mais teve representatividade, por ser o mais estudado e o que tem mais representantes de bactérias diazotróficas, compilando a maior parte de microrganismos com potencialidade de fixar nitrogênio, sendo de grande importância para as culturas de arroz (Garcia et al. 2015). Das cinco classes desse filo, as mais encontradas foram as Alpha e Betaproteobacteria, essas classes são abundantes no arroz, sendo essenciais no funcionamento do ecossistema na regulação do ciclo de carbono (C), nitrogênio (N), enxofre(S) e ferro (Fe) (Sun et al. 2015).

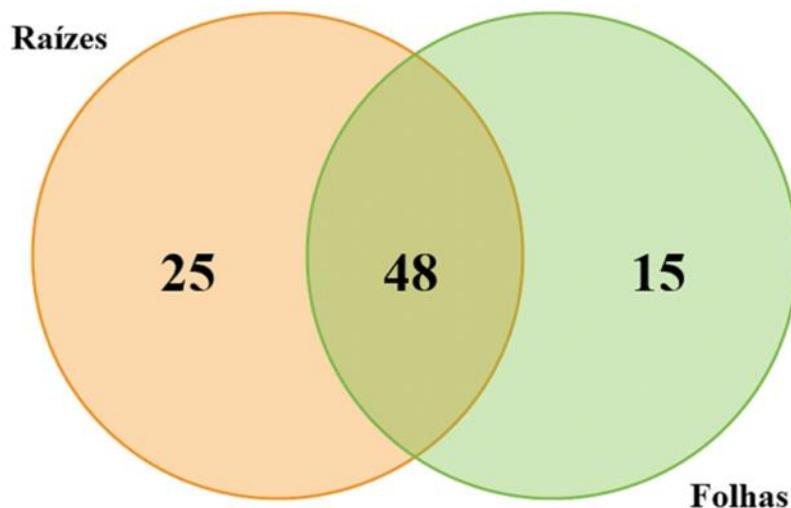
Auxiliam também produzindo antibióticos em resposta a patógenos, sejam eles bacterianos e/ou fúngicos (SON, 2013) e na síntese de fitohormônios que ajudam no crescimento das plantas (Lee et al., 2006). Dada a importância potencial das Alfa -, Beta -, Gamaproteobacterias e Deltaproteobactérias têm forte papel na disponibilidade de nutrientes, promoção do crescimento e inibição de doenças (DONOT, 2012). De todas as classes, a que menos teve representatividade, a Epsilonproteobacteria, é apresentada em estudos demonstrando a característica de serem mais presentes em locais extremos em termos de fatores abióticos (SU et al., 2014) sugerem que elas pouco interagem com outras Proteobacterias.

No total foram encontrados cerca de 14 filos que estão presentes tanto nas amostras analisadas de folhas e raízes. Destes se destacam por estarem presentes nos dois compartimentos *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Fimicutes*, *Cyanobacteria*, *Nitrospirae*, foram as mais encontradas. De modo, que unicamente em folhas não estavam presentes *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Fibrobacteres* e *Flavobacteria* (Figura 8). Sendo os grupos das *Firmicutes*, *Acidobacterias* e *Bacteriodesetes*, foram encontradas e classificadas como as que mais possuíam gêneros representantes entre as amostras.



**Figura 8.** Diversidade de filos das OTUs detectadas nas amostras, exceto as sub-divisões do grupo Proteobacterias, de acordo com sua abundância relativa.

Já em relação aos gêneros encontrados em arroz, as raízes tiveram maior diversidade (25), sendo 15 para folhas e 48 encontrados em ambos (Figura 9). Os gêneros encontrados estão catalogados no Anexo.



**Figura 9.** Diagrama de Venn mostrando os gêneros bacterianos compartilhados e únicos.

Dos gêneros encontrados unicamente em raízes os *Rhizobium*, *Spirochaeta*, *Bradyrhizobium* são característicos do ambiente, apresentando potencialidade para bioprodutos (ZHENG et al., 2013); Na fixação de N, já que agem na absorção de S orgânico e inorgânico, importantes na síntese da nitrogenase e de outras proteínas ferro-S participantes na fixação de nitrogênio, compilando dados desse trabalho com os encontrados por Cordeiro (2014) que avaliou estirpes desse gênero em culturas de arroz, milho, soja e feijão e perceberam que houve aumento de biomassa; um trabalho feito por Silva et al . (2014).

As *Nitrospira* estão entre os nitrificadores mais diversos, além da alta eficiência em fixação N<sub>2</sub> por algumas espécies como a *N. moscoviensis* que se descobriu possuir genes que codificam uma uréase e divide a ureia em amônia e CO<sub>2</sub>, apresentando uma flexibilidade metabólica ao utilizar com ou sem oxidação do nitrito, usando oxigênio, nitrato ou os dois como aceptores finais de elétrons, mostrando a versatilidade na participação de processos na ciclagem do N (ZHANG, 2011).

As *Achromobacter* mesmo sendo identificadas nas raízes possuem eficiência de utilização do N na parte aérea; na produtividade de grãos, dando um grande rendimento nos índices de colheita na biomassa em gramíneas (CORDEIRO, 2014), Mesmo assim há diferenças na quantidade desses gêneros em folhas e raízes, sugerindo que a colonização desses grupos em diferentes compartimentos no vegetal, a procura por regiões-alvo do gene 16S rRNA, em abordagens de sequenciamento e profundidades de sequenciamento em diferentes estudos, trazem resultados além da diversidade, dos tipos que mais são encontrados nos microbiomas (COSTA et al. 2014).

Nas amostras de folhas os gêneros mais expressivos e que possuem propriedades benéficas às plantas os *Chthoniobacter* que tem envolvimento na quebra do carbono orgânico, *Desulfomicrobium* e *Acanthopleuribacter* tem grande eficiência na redução de sulfato em sulfeto, e na presença de sulfato, piruvato e lactato são oxidados incompletamente em acetato e importantes no processo de transformação de compostos nocivos em compostos assimiláveis pelas plantas (MELCHER et al., 2014). Sendo interessante a presença do gênero *Nitrospirae* responsável em reduzir o sulfeto assim como os outros gêneros falados, contudo, sua capacidade em arroz foi proposta por Mark et al. (2019) em solo anóxico e foi significativo na redução de sulfato. Logo, esses genros em especial, possuem potenciais e conjunto para posteriores pesquisas, podendo ser feitas de maneira integrada.

Os gêneros encontrados nas duas partes (folhas e raízes) apresentam importantes contribuições no crescimento das plantas. Os *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Acetobacter*, trazem resultados positivos na fixação biológica de nitrogênio (FBN), e na síntese de hormônios nas plantas, entre outros. Nos estudos feitos pela Embrapa Amazônia Ocidental e Embrapa Soja com *Azospirillum*, enfatiza a fixação de N demonstrando aumento de biomassa e rendimentos de cultivares de interesse econômico, como milho, sorgo e arroz, nas pesquisas a inoculação com *Azospirillum brasiliense*, no que se refere a produção de fitohormônios, representantes desse gênero junto com *Herbaspirillum*

trazem uma resposta eficaz na síntese de auxinas e inibição da produção de indóis em arroz e milho (DONOT et al, 2012).

Bactérias de vida livre como as do gênero *Beijerinckia*, possuem a função de fixação de nitrogênio atmosférico, tendo um diferencial de outros diazotróficos, apresentando uma grande tolerância a ácidos, sendo capazes de crescer e fixar nitrogênio em pH 3,0-4,0 (Becking, 2006), possuindo subclasses compartilhadas com *Mycobacterium*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Acetobacter* e *Gluconobacter*, e parentesco com algumas espécies de *Xanthomonas*, e *Rhizobium*, que nesse trabalho foram encontradas apenas nas folhas e raízes, respectivamente.

O gênero *Burkholderia* é bastante estudado, por sua capacidade de inoculação não só em partes como raízes e folhas, mas são encontrados em sementes e em plântulas de arroz, auxiliando na produção do fitohormônio auxina/ácido 3-indolacético promovendo crescimento vegetal (MAROPOLA et al. 2015). Em trabalhos onde há a presença de *Burkholderia* em folhas de arroz, houve um aumento na capacidade de assimilação de fontes de carbono presentes no solo, também notado em raiz com o aumento da zona pilífera (Melotto, 2006).

Outro gênero já bem caracterizado por sua grande eficiência na promoção de crescimento, através da fixação de N e produção de fitohormônios, sendo ele o *Gluconacetobacter*, é muito associado à cultura do arroz, em trabalho onde se constatou a utilização do ácido 2-ceto glucônico como uma fonte de carbono, favorecendo a fixação de nitrogênio (MENESES et al., 2011), tendo habilidade até em condições microaerófilas (BARBOSA, 2014), além de ser benéfica para o arroz agronomicamente, estudos feitos por Santos, 2017., e Barbosa, 2014 ao relacionar a inoculação de *G. diazotrophicus* com aumento na expressão de genes P5CR e BADH que expressam osmoprotetores como prolina e glicina-betaína contra estresse hídrico em arroz, e um maior rendimento em massa seca e capacidade em ser biofertilizantes. Além de funções de fixação, o *Acetobacter* e *Herbaspirillum* também apresentaram a capacidade de alta produção de AIA que contribuem para o crescimento vegetal, enquadrando todos esses gêneros encontrados no arroz com características complementares.

Ao analisar e comparar os grupos bacterianos presentes nas raízes e folhas, podemos verificar que há uma maior variedade de bactérias endofíticas presentes nas raízes, que em partes aéreas da planta, sugerindo as raízes como a principal porta de entrada de endofíticos para as plantas hospedeiras (MILIUTE et al., 2015). Isso não só pela maior diversidade que o ambiente radicular tem, mas também pela melhor forma de adentrar nas plantas, pelo ambiente ser menos hostil em termos de intempéries como visto nas partes mais altas (PEREIRA et al.,

2011). Todavia, também foram mencionados trabalhos com a presença de espécies dos gêneros compartilhados entre as duas partes, pelas quais tiveram uma maior quantidade de gêneros encontrados.

Os dados do presente trabalho, juntamente com os da literatura, permitiram a identificação de bactérias endofíticas mais citadas e com características similares entre si. Comparando a composição desse grupo com OTUs detectada no presente trabalho, é possível observar que 13 OTUs, pertencentes a todos gêneros, estão incluídas no grupo de gêneros mais citados. Os gêneros foram *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Acetobacter* foi interessante notar que todos desse grupo também são encontrados na endosfera de outros tipos de arroz, de sorgo e milho (PANDEY et al., 2014).

Estes resultados indicam um padrão da endosfera entre a família *Poaceae*, tais como bactérias que possibilitam maior fixação de Nitrogênio, diferentes fontes de obtenção de Carbono, participação na biossíntese de fitormônios, proteção contra patógenos e agentes abióticos, possibilitando crescimento vegetal e um maior rendimento agrônômico. Mesmo essa diferença sendo mostrada, traz uma sugestão de que as plantas podem escolher microrganismos que as apoiam, atendendo às necessidades fisiológicas comuns entre os tipos de arroz. Ao encontrar microrganismos similares a essas culturas, se observa que a remontagem de microbiomas da filosfera a partir dos dados brutos das análises do genoma da planta é possível, e este amplo estudo de associação do genoma pode lançar luz sobre a identificação de fatores funcionais que regulam as interações planta-microbioma.

## 5. CONCLUSÃO

Foi observada a detecção da prevalência de Proteobactérias em todas as amostras e, entre elas, as bactérias que podem contribuir para a fixação biológica do nitrogênio no arroz conforme relatado anteriormente.

Foi possível detectar gêneros já conhecidos por suas propriedades de BPCP. Havendo a identificação da composição de representantes com tais potencialidades que habitam locais distintos no arroz, abrindo discussão para trabalhos mais profundos sobre características que as fazem se estabelecerem concomitantemente.

As principais OTUs encontradas em ambas as amostras pertenceram a *Firmucutes*, *Bacteroidetes*, *Actionobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Planctomicetes*.

## REFERENCIAS

- AGROEMDIA.2018.**Embrapa lança 1ª cultivar de arroz vermelho desenvolvido no Brasil**. Disponível em:<<https://agroemdia.com.br/2018/11/27/embrapa-lanca-1a-cultivar-de-arroz-vermelho-desenvolvida-no-brasil/>>. Acesso em: 22 de abr. 2020.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic localalignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- APAVA. **Levantamento da Safra (2018)**. Disponível em:<<http://www.abiarroz.com.br/detalhe-noticias?id=155>>. Acesso em : 23 de Jan. 2020.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and Ecology of Herbaspirillum Seropedicae and the Closely Related Pseudomonas Rubrisubalbicans. **Symbiosis**, v. 13, n. 1–3, p. 65–73, 1992.
- BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. Bioremediation of petroleum wastewater by hyperphenol tolerant Bacillus cereus: Preliminary studies with laboratory-scale batch process. **Bioengineered**, v. 8, n. 5, p. 446–450, 2017.
- Banwart, S.A; Black, H.; Ingram, J.; Joosten, H., Milne, E., Noellemeyer, E. Benefícios do carbono do solo. **Capítulo Prospecção no Anuário do PNUMA**. 2012. pp. 19–33. ISBN 9789280732146.
- BAO, Z.; OKUBO, T.; KUBOTA, K.; KASAHARA, Y.; TSURUMARU, H.; ANDA, M.; IKEDA, S.; MINAMISAWA, K. Metaproteomic identification of diazotrophic methanotrophs and their localization in root tissues of field-grown rice plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5043–5052, 2014.
- BARBERÁN, A.; BATES S.T.; CASAMAYOR, E.O.; FIERER, N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **The Isme Journal**, New York, v.6, p. 343-351, 2012.
- BARBOSA, J. Z.; CONSALTER, R.; MOTA, A. C. V. Fixação biológica de nitrogênio em Poaceae. **Evidência**, v. 12, n.1, pp. 7-18. 2014.
- BARRETO, H. B. F. **Variabilidade espacial de atributos do solo que influenciam a produção de arroz vermelho no vale do apodi-RN**. Mossoró, RN, 2012, 60f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Federal Rural do Semiárido.
- BARZON, L.; LAVEZZO, E.; MILITELLO, V.; TOPPO, S.; PALÙ, G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 11, p. 7861–7884, 2011.
- BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, 2013.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Journal of Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 980–988, out. 1998.

BENTLEY, D. R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SMITH, A. J. Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 1–10, 2014.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30–37, 2014.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I.B.; NETO, O.M.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, H.; THOMPSON, F. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic Forest soils. **Microbial Ecology**, New York, v.60, p.840-841, 2010.

BURBANO, C. S.; LIU, Y.; RÖSNER, K. L.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Predominant nifH transcript phylotypes related to *Rhizobium rosetiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 383–389, jun. 2011.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; NOAH FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 4516–4522, 2012.

CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 745–755, 2015.

CHO, S.; JUNG, K.; KIM, D.; KWON, J.; IJAZ, U. Z.; SHIN, S. G. Bacterial community analysis in upflow multilayer anaerobic reactor treating high-solids organic wastes. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 5, p. 1226–1234, 2017.

CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 26, jan. 2014.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C. GALINDO, S.S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951–962, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA MEIO-NORTE). 2018. **Variedade de Arroz Vermelho BRS 901**. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/meio-norte/eventos/-/evento/256038/variedade-de-arroz-vermelho-brs-901>>. Acesso em: 22 de abr.2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA).2011. **Arroz vermelho em extinção**. Disponível em <[www.cnpaf.embrapa.br/eventosenoticias/anteriores/anteriores/060109.ht](http://www.cnpaf.embrapa.br/eventosenoticias/anteriores/anteriores/060109.ht)>.Acesso em: 22 de abr.2020.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL(EMATER).2019. **Plano anual de trabalho da EMATER (2019)**. Disponível em:<[http://www.emater.tche.br/site/arquivos/relatorio-institucional/PAT\\_2019.pdf](http://www.emater.tche.br/site/arquivos/relatorio-institucional/PAT_2019.pdf)>. Acesso em: 02 fev.2020.

FIGUEIREDO, M. V.; BURITY, H. A.; MARTÍNEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied soil ecology**, v. 40 n.1, p. 182-188.2014.

GRANGEASSE, C.; TERREUX, R.; NESSLER, S. Bacterial tyrosine-kinases: structurefunction analysis and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 3, pp.628-634, 2010.

HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 26. 2014.

IRGA-Instituto Riograndense de Arroz. **Informações de mercado, safras 2017/2018**. Disponível em: <<https://irga-admin.rs.gov.br/upload/arquivos/201807/30100758-boletim-final-da-safra-201-18-final.pdf>>.Acesso em : 14 de Jan. 2020.

KARRA, A.S.; STIPPEC, S.; COBB, M. H. Assaying protein kinase activity with radiolabeled ATP. **Journal of Visualized Experiments**, v. 123, p.55504, 2017.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plantgrowth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**. v. 162, p. 426-435,2011.

LEE, S.; ISHIGA, Y.; CLERMONT, K.; MYSORE, K. S. Coronatine inhibits stomatal closure and delays hypersensitive response cell death induced by nonhost bacterial pathogens. **PeerJ**, v. 1, p. 34, 2013.

LI, Y.; HUANG, F.; LU, Y.; SHI, Y.; ZHANG, M.; FAN, J.; WANG, W. Mechanism of plant-microbe interaction and its utilization in disease-resistance breeding for modern agriculture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 51–58, 2013.

LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A. A. C.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1829–1836. 2010.

MAGALHAES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, n.1, pp. 417-430, 2018.

MAGNANI, G. S.; CRUZ, L. M.; WEBER, H.; BESPALHOK, J. C.; DAROS, E.; BAURA, V.; YATES, M. G.; MONTEIRO, R. A.; FAORO, H.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4549–4558, jan. 2013.

MAREQUE, C.; TAULÉ, C.; BERACOCHEA, M.; BATTISTONI, F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 1057–1067, 2014.

MARK, W.J; PALVA, A.; SUSAN, L. LAPIDUS, A.; TIJANA, G. Sequência genômica de *Chthoniobacter Flavus* Ellin428, uma bactéria aeróbia heterotrófica do solo. **Journal of Bacteriology**, v193, pp.2902–3. 2019.

MAROPOLA, M. K. A.; RAMOND, J. B.; TRINDADE, M. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). **Journal of Microbiological Methods**, v. 112, p. 104–117, 2015.

MELCHER, U.; VERMA, R.; SCHNEIDER, W. L. Metagenomic search strategies for interactions among plants and multiple microbes. **Frontiers in plant science**, v. 5, pp. 268, 2014.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Y. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. **Cell**, v. 126, n.1, p. 969–980, 2006.

MENDES, L.W.; KURAMAE, E.E.; NAVARRETE, A.A.; VAN VEEN, J.A.; TSAI, S.M. MENESES, C.H.S.G.; GONÇALVES, T.; ALQUÉRES, S.; ROUWS, L.; SERRATO, R.; VIDAL, M.; BALDANI, J.I. *Gluconacetobacter diazotrophicus* exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization. **Plant and Soil**, v. 416, p. 133-147, 2017.

MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; LOPES, H. M.; PEREIRA, M. B. Caracterização Morfoagronômicas em arroz vermelho e arroz de sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 4, p. 490-499. 2011.

MENEZES, B.R. DA S.; MOREIRA, L.B.; PEREIRA, M.B.; LOPES, H.M.; COSTA, E.M.; CURTI, A.T.M. Características Morfoagronômicas de dois genótipos arroz vermelho em cultivo inundado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.7, n.1, pp.394-401. 2012.

METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.

Miliute, I.; Buzaitė, O.; Dalia, S.; Danas, B. Plant growth promoting and antagonistic properties of endophytic bacteria isolated from domestic apple. **Zemdirbyste-Agriculture**. v.103. 77-82, 2015.

MUKHERJEE, S. and A. L.; SENGUPTA, S.; PAPRI, B.; MUKHERJEE, A. Abiotic stress regulates expression of galactinol synthase genes post-transcriptionally through intron retention in rice. **Springer**, v. 249, n.3, pp. 891-912, 2018.

NCBI - **National Center for Biotechnology Information (2013) Taxonomy Browser.**

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>>. Acesso em: 14 de Mar. 2020.

NIKOLIC, B.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Metagenomic analysis of the 1 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene (*acdS*) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum tuberosum* L. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 9, p. 665–676, 2011.

OUYANG, Y.; DAI, S.; XIE, L.; KUMAR, M. S. R.; SUN, W.; SUN, H.; TANG, D.; LI, X. Isolation of high molecular weight DNA from marine sponge bacteria for BAC library construction. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 318–325, 2010.

PANDEY, V. C.; SINGH, J. S.; SINGH, D. P.; SINGH, R. P. Methanotrophs: promising bacteria for environmental remediation. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 241–250, 2014.

PARTE, A. C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 42, pp. D613–D616, 2013.

PEREIRA, W.; REIS, V. M. Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Instituto de Agronomia**, v. MS, p. 70, 2011.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403–415, 2015.

REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. **Molecular Cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, 2015.

REYES-DUARTE, D.; FERRER, M.; GARCÍA-ARELLANO, H. Functional-based screening methods for lipases, esterases, and phospholipases in metagenomic libraries. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 101–113, 2012.

RODRIGUES, L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, n. 1, p. 11–19, 2009.

RODRIGUES, N. J.; MALAVOLTA, V. A.; VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**. 2010, v.12, n.1, p.16-22, 2010.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; JACQUES, R; BENTO, F; CAMARGO; F.A. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World Journal Microbiology of Biotechnology**, Oxford, v.26, p.1503-1508, 2010.

ROSS, M. G.; RUSS, C.; COSTELLO, M.; HOLLINGER, A.; LENNON, N. J.; HEGARTY, R.; NUSBAUM, C.; JAFFE, D. B. Characterizing and measuring bias in sequence data. **Genome biology**, v. 14, n. 5, p. R51, 2013.

Roychoudhury, A.; Saikat, P. Transcriptome Profiling of Abiotic Stress-Responsive Genes During Cadmium Chloride-Mediated Stress in Two Indica Rice Varieties. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, n.1, p. 657-667, 2018.

SALONEN, A.; NIKKILÄ, J.; JALANKA-TUOVINEN, J.; IMMONEN, O.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; KEKKONEN, R. A.; PALVA, A.; DE VOS, W. M. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 127–134, 2010.

SANTOS, B. C. **Inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* como agente mitigador do estresse hídrico em plantas de arroz vermelho**. Campina Grande, PB, 2018, 32f. Monografia (Centro de Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba.

SEGATA, N.; HUTTENHOWER, C. Toward an efficient method of identifying core genes for evolutionary and functional microbial phylogenies. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24704, 2011.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif- mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

SHANNON, C. E. The Mathematical Theory of Information. MD computing. **Computers in medical practice**, v. 14, n. 4, p. 306–317, 1949.

SHAW, J. L. A.; MONIS, P.; WEYRICH, L. S.; SAWADE, E.; DRIKAS, M.; COOPER, A. J. Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6463–6473, 2015.

SILVA FERREIRA, J.; IVO BALDANI, J.; DIVAN BALDANI, V. L. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 1, 2010.

SILVA, B.R.S. **Abordagem metagenômica para isolamento de uma nova celulase em restos culturais de arroz vermelho**. Campina Grande. PB, 2017, 61f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba.

SILVA, R. P. A. **Eficiência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento da tolerância de arroz vermelho à deficiência hídrica na fase inicial de desenvolvimento**. Campina Grande. PB, 2016, 115f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688–688, 30 abr. 1949.

SLOW FOOD BRASIL, **Fortaleza do arroz-vermelho**. 2007. Disponível em: <<http://www.slowfoodbrasil.com/content/view/130/60/>> .Acesso em: 20 mai.2020.

SOARES, M. F. L. **Produção de arroz vermelho no Vale do Piancó**. Itaporanga, PB, 2014. 23f. Monografia (Especialização em Fundamentos da Educação: Práticas pedagógicas Interdisciplinares)-Universidade Estadual da Paraíba.

SOLOVYEV, V.; SALAMOV, A. Metagenomics and its Applications in Agriculture; Biomedicine and Environmental Studies. **Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences**, v.1, n. 3, p. 61–78, 2011.

SON, H.-M.; YANG, J.-E.; PARK, Y.; HAN, C.-K.; KIM, S.-G.; KOOK, M.; YI, T.-H. *Sphingomonas kyunghensis* sp. nov., a bacterium with ginsenoside-converting activity isolated from soil of a ginseng field. **Journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3848–3853, 2013.

SU, J. Q.; WEI, B.; XU, C. Y.; QIAO, M.; ZHU, Y. G. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China. **Environment International**, v. 65, p. 9–15, 2014.

TAUPP, M.; MEWIS, K.; HALLAM, S. J. The art and design of functional metagenomic screens. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 465–472, 2011.

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons' study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): Expression of nifH genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, n. 1, p. 435–449. 2011.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3. 2012.

TIMP, W.; MIRSAIDOV, U. M.; WANG, D.; COMER, J.; AKSIMENTIEV, A.; TIMP, G. Nanopore sequencing: Electrical measurements of the code of life. **Transactions on Nanotechnology**, v. 9, n. 3, pp. 281–294, 2010.

VIRUPAKSHI, S.; NAIK, G. R. Purification of DNA from chloroplast and mitochondria of sugarcane. **Current Science**, v. 92, n. 11, p. 1613–1619, 2007.

WILSON, M. C.; PIEL, J. Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. **Chemistry and Biology**, v. 20, n. 5, p. 636–642. 2013.

XIAO, S. Gene Technology Protecting Crops from Pathogens : Novel Approaches to An Old Problem. **Gene Technology**, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2012.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics* . **Yi chuan xue bao**, v. 38, n. 3, p. 95–109, 2011.

ZHENG, X.; LU, C.; WANG, X.; ZHENG, H. SLAF-seq: An Efficient Method of Large-Scale De Novo SNP Discovery and Genotyping Using High-Throughput Sequencing. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58700, 2013.

**Anexo - Relação dos gêneros encontrados em raiz e folhas**

Gênero	Raiz	Raiz/Folha	folha
1	Achromobacter	Acetobacter	Acanthopleuribacter
2	Bradyrhizobium	Acidocella	Ancylobacter
3	Chondromyces	Acidobacterium	Chthoniobacter
4	Delftia	Agrobacterium	Cytophaga
5	Desulfobacterium	Arthrospira	Desulfomicrobium
6	Dokdonella	Azospirillum	Fusobacterium
7	Erwinia	Azorhizobium	Leptospirillum
8	Flavobacterium	Bacillus	Leuconostoc
9	Fibrobacter	Bacteroides	Luteolibacter
10	Geobacter	Beijerinckia	Nitrospirae
11	Mesorhizobium	Burkholderia	Sphingobium
12	Microbacterium	Caulobacter	Spirosoma
13	Nitrospira	Chloracidobacterium	Streptococcus
14	Novosphingobium	Clostridium	Telmatobacter
15	Nitrolancea	Crupiavidus	Xanthomonas
16	Opitutus	Dyella	
17	Pedosphaera	Enterobacter	
18	Pelobacter	Escherichia	
19	Planctomyces	Filimonas	
20	Pontibacter	Geothrix	
21	Rhizobium	Gluconacetobacter	
22	Serratia	Gluconobacter	
23	Spirochaeta	Herbaspirillum	
24	Sporosarcina	Holophaga	
25	Sulfurospirillum	Ilyobacter	
26		Kaistia	
27		Klebsiella	
28		Labrys	
29		Listeria	

---

30	Methylobacterium
31	Mycobacterium
32	Mycoplasma
33	Ochrobactrum
34	Paenibacillus
35	Pantoea
36	Phaeospirillum
37	Plesiopocystis
38	Prostheco bacter
39	Pseudomonas
40	Rickettsia
41	Sinorhizobium
42	Sphingomonas
43	Staphylococcus
44	Swaminathania
45	Telmatospirillum
46	Terriglobus
47	Wolbachia
48	Xanthobacter

---