



pPNA: UMA FERRAMENTA MOLECULAR NO BLOQUEIO DE AMPLICONS ORGANELARES DO MICROBIOMA RADICULAR DE SOJA

Flávia Caroline Gan, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel¹

Anderson Santos de Freitas, discente de pós-graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel²

Luiz Fernando Würdig Roesch, docente, Universidade Federal do Pampa³

flaviagan.aluno@unipampa.edu.br¹

Um dos problemas enfrentados para se caracterizar eficientemente comunidades bacterianas associadas a plantas, é a co-amplificação das sequências de cloroplastos e mitocôndrias da própria planta hospedeira. Essas organelas compartilham um ancestral em comum com microrganismos e conseqüentemente, possuem similaridade de sequência de DNA com algumas linhagens bacterianas. Isso acaba por gerar dados metagenômicos com alto número de sequências que necessitarão serem removidas em etapas extras no processamento dos resultados. Uma das abordagens recentes para evitar esse problema, é a utilização de primers *blockers*. Esses primers possuem alta especificidade com sequências de 16S organelares, como é o caso do Polímero de Ácido Nucleico (PNA), que se liga no DNA de cloroplastos e mitocôndrias e não é reconhecido como um iniciador pela DNA polimerase na reação em cadeia da polimerase (PCR), e conseqüentemente, impede que sejam gerados *amplicons*. Com isso, o objetivo foi testar a eficiência do primer *blocker* de plastídio pPNA no bloqueio da amplificação de sequências de 16S plastidial e mitocondrial de raízes de soja. Para isso, foram coletadas dezesseis amostras de raízes de soja (*Glycine max*), de uma região rural do município de São Gabriel, RS. O DNA microbiano das raízes foi extraído utilizando o kit comercial PowerSoil® DNA (MoBio, USA). A região V4 do gene 16S foi amplificada por PCR, com volume de reação de 25µL, onde metade das amostras receberam 0,25 µM de primer pPNA (PP01 – GGCTCAACCCTGGACAG). As amostras foram purificadas, quantificadas e após sequenciadas utilizando a plataforma *Ion Torrent PGM*. O pré-processamento dos dados brutos do sequenciamento foram analisados utilizando QIIME2. Para o controle de qualidade e filtragem das sequências foi utilizada a pipeline DADA2 e posteriormente a taxonomia obtida utilizando banco de dados SILVA (versão 132). Os resultados da análise taxonômica indicaram uma abundância média total de sequências de cloroplasto nas amostras que não receberam o pPNA de 46,92% (± 23,94%). Já a abundância mitocondrial média obtida nas mesmas amostras foi de 10,62% (± 20,55%). As amostras que foram amplificadas com o primer pPNA não apresentaram sequências de cloroplasto, indicando que o primer bloqueador inibiu a amplificação do 16S plastidial. Por outro lado, observou-se em média 0,36% (± 1,05%) de DNA mitocondrial. Os resultados obtidos indicaram que o pPNA possui uma alta especificidade resultando em bloqueio total na amplificação do fragmento de DNA 16S plastidial, além de uma alta capacidade de bloqueio de sequência de DNA 16S mitocondrial no microbioma radicular de soja. Sendo assim, caracteriza-se por ser uma ótima ferramenta para estudos de metagenômica do microbioma associado a plantas de soja.

Agradecimentos: CNPq, CAPES, UNIPAMPA.

Palavras-chave: Sequenciamento; *Glycine max*; Reação em cadeia da polimerase; Metagenômica.