



CONSTRUÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE BIBLIOTECAS DE cDNA PARA A INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA À SALINIDADE NA ÁRVORE DE MANGUE *AVICENNIA SCHAUERIANA*

Palavras-Chave: Estresse salino; Sequenciamento de RNA; Manguezal.

Autores:

Rodrigo Dutra Campos, LAGM –Unicamp

Prof.^a Dra. Anete Pereira de Souza (orientadora), LAGM - Unicamp

INTRODUÇÃO:

A salinidade do solo é um importante estressor ambiental que restringe o crescimento e a produção da maioria das plantas. Compreender as respostas moleculares associadas à tolerância ao sal será extremamente importante à luz da crescente demanda por culturas alimentares e bioenergia e em face às alterações recentes no clima. Localizada ao longo das regiões intertidais, a árvore de mangue *Avicennia schaueriana* colonizou e evoluiu uma série de características fisiológicas e metabólicas que a permitiu se tornar bem adaptada a solos altamente salinos. Apesar disso, devido à escassez de recursos genômicos, seus mecanismos moleculares de resistência ao sal, até onde sabemos, nunca foram antes explorados. Assim o principal intuito deste projeto é realizar o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) de folhas, caules e raízes de *Avicennia schaueriana* popularmente conhecido como mangue preto, para elucidar a regulação transcricional da adaptação à salinidade nesta espécie.

METODOLOGIA :

Este presente projeto iniciou-se ao coletar 40 mudas de *A. schaueriana* de aproximadamente 2 meses de idade, no estuário do município de Praia Grande - SP. Que foram transportadas para uma estufa na casa de vegetação no instituto de biologia da unicamp, para sua aclimação por três semanas em vasos que continham metade areia e metade terra arável, para o experimento, separamos as mudas em 5 grupos com 5 plantas cada. Cada grupo foi regado com diferentes concentrações de NaCl (sal) sendo de 0 g/L-1/;

15g/L-1/; 30g/L-1/; 60g/L-1/ e 90 g/L-1/. Após isto, as plantas foram coletadas e armazenadas a temperaturas de -80°C , evitando assim a degradação do material, para posterior extração de RNA.



FIG 3: Plantas com salinidade variada.

Amostras de folhas, caules e raízes, com 5 réplicas biológicas e três réplicas técnicas foram utilizadas para a extração do RNA, conforme protocolo de Oliveira et al. (2015). Para isso, o material armazenado foi macerado com o auxílio de um cadinho de porcelana e nitrogênio líquido (N_2), colocando as amostras em eppendorfs (tubos de plástico) separados por indivíduo, concentração de sal e tecido vegetal.

Posterior a este processo dá se início a quebra da parede química do material, adicionando 1 ml de tampão de extração, seguido pelo vortex do material por 2 minutos, para a homogeneização completa da mistura. Após este procedimento é adicionado $600\mu\text{l}$ de fenol ácido, sucedido por uma nova rodada de vortex, agora por 1 minuto (deste ponto até o adicionar de Álcool Isoamílico gelado será repetido mais uma vez), em seguida, os eppendorf são então centrifugados por 20 minutos para a separação do material em duas fases das quais a superior é colocada em um novo eppendorf enquanto a outra é descartada e foi adicionar o mesmo volume de clorofórmio (Álcool Isoamílico gelado), depois de se repetir o processo o material foi a vortex por 1 minuto e a centrifuga por 20, a fase superior e transposta para um novo eppendorf e colocou-se a metade do volume do material em cloreto de lítio, o material é homogeneizado e incubado por 3 horas a -80°C .

Assim passado este tempo dá se início ao processo de filtração, onde o material foi centrifugado por 50 minutos. Descarta-se todo o líquido, restando apenas o pellet (pequena porção de amostra translúcida e sólida). Acrescenta-se $500\mu\text{l}$ de LiCl (cloreto de lítio), novamente se centrifugar agora por 15 minutos. Então o líquido é novamente descartado, sendo adicionado $300\mu\text{l}$ de H_2O DEPC ao pallet, e vortexar-se o material. Acrescenta Se $100\mu\text{l}$ de acetato de sódio e $800\mu\text{l}$ de etanol absoluto gelado.

Para se dar início ao processo de precipitação, o material foi deixado parado a -20°C por uma noite. No dia seguinte ele é centrifugado por 50 minutos. O líquido é descartado e adicionado $500\mu\text{l}$ de etanol 70% gelado, e novamente centrifugado por 10 minutos. O líquido é descartado e se coloca $500\mu\text{l}$ de etanol 100% gelado, ele então é novamente centrifugado por 10 minutos e o pallet é totalmente secado ficando para isto 2 horas no fluxo.

A quinta e última etapa da extração e ressuspensão do material que se dá ao se adicionar 30µl de H₂O DEPC.

Após a realização da extração do material dá-se início a avaliação de sua integridade em gel de agarose 1%. Onde o material é colocado e “corre o gel” devido à diferença eletromagnética que a máquina gera, já que os RNAs que são negativos correm para o lado positivo em bandas de material de modo que quando mais integra a molécula mais forte serão as bandas do material (Sambrook, J., & Russell, D. W. 2001). Após correr por uma hora o gel é colocado em brometo por 15 minutos e depois em na água pelo mesmo período, em sequência sendo colocado no leitor.

O material também foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), que verifica a quantidade de material que foi extraído.

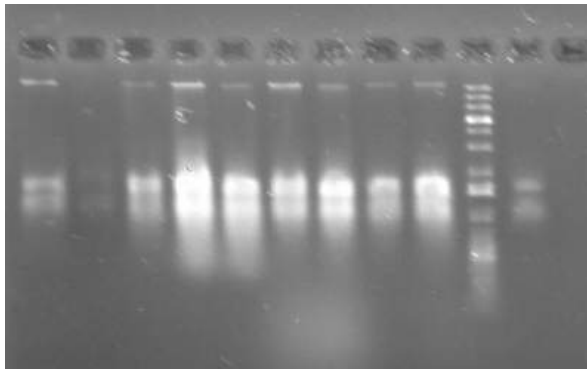


FIG.2: Gel de agarose, concentrações 0_15_30 g/L-1

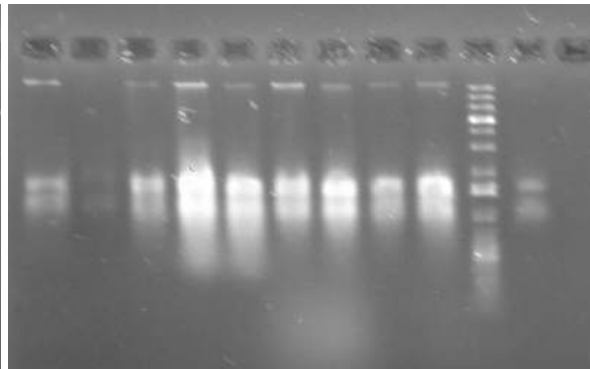


FIG.3: Gel de agarose, concentrações 60_90 g/L-1

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Este projeto obteve como resultado dos experimentos realizados até o momento, RNAs íntegros e em grande quantidade extraídos de diferentes partes da *A. schaueriana* (folhas, raízes e caules), submetido a várias salinidades diferentes (0 g/L-1/; 15g/L-1/; 30g/L-1/; 60g/L-1/ e 90 g/L-1/), possibilitando deste modo que com tal material possa se inferir após a construção de uma biblioteca de cDNA e seu eventual sequenciamento, quais respostas moleculares são responsáveis pela tolerância à alta salinidade as quais o mangue preto está tão adaptado, o'que por sua vez pode futuramente auxiliar em programas de melhoramento genético em plantas de cultivo comum.

CONCLUSÕES:

Nosso estudo fornece material para a construção de bibliotecas de cDNA e o sequenciamento do primeiro transcriptoma de resposta ao sal da extremófila *A. schaueriana*, gerando recursos valiosos que possam contribuir com o desenvolvimento de cultivos para agricultura sustentável e em estratégias eficazes de conservação, especialmente diante da crise global das alterações climáticas.

BIBLIOGRAFIA

Colmer, T. D., & Flowers, T. J. (2008). Flooding tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179(4), 964–974. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02483>.

Oliveira, R. R. Viana, A. J. C. Reátegui, A. C. E. & Vincentz, M. G. A. An efficient method for simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from various plant tissues. *Genet. Mol. Res.* 14, 18828–18838 (2015).

Tomlinson, P. B. (1986). *The Botany of Mangroves*. In Cambridge University Press (2o edição).

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (pp. 7.32-7.33). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, J.-K., & Shabala, S. (2020). Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. *The Innovation*, 1(1), 100017. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>