

# Otimização da Metodologia de Extração e Amplificação do DNA de Fungos do Solo

## Introdução

Os fungos são organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos em um micélio (conjunto de hifas) contínuos ou septados. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção. Estão agrupados em um grande reino, o dos Fungi, abrangendo os fungos filamentosos, as leveduras e os cogumelos. São saprofitos ou parasíticos facultativos ou biotróficos.

Os fungos se destacam pelas inúmeras aplicações que apresentam nas áreas de saúde, nutrição, agricultura, energia e meio ambiente. São eles os principais responsáveis pela decomposição de resíduos vegetais e pela ciclagem de nutrientes no solo, degradam substâncias tóxicas, promovem o crescimento de plantas pelo auxílio na absorção de nutrientes e no controle de patógenos. Destacam-se também pela enormidade de espécies existentes, cerca de 70.000 descritas e conservadas em coleções no mundo inteiro. Entretanto, apenas 1% das espécies de fungos são conhecidas, indicando que, provavelmente, além das espécies úteis descritas, muitas outras poderão ainda ser descobertas, implicando em avanços biotecnológicos.

Nesses últimos anos, com a introdução de novas técnicas fora do contexto de cultivo em meios de cultura, como análise de proteínas, açúcares e muitas outras técnicas biotecnológicas, como sondas de DNA, caracterização molecular, análises genômicas, muitas modificações têm sido introduzidas no processo de manipulação genética das espécies importantes e de genes de interesse dos fungos.

A informação genotípica contida no DNA possibilita fazer comparações entre microrganismos. Como utilizar a estrutura primária do DNA é complicado, tem-se usado para comparar seqüências gênicas o RNA ribossomal (rRNA), que possui regiões extremamente conservadas e regiões altamente variáveis entre os organismos e regiões que podem variar de um táxon a outro. Para a identificação molecular de fungos, têm sido utilizadas as regiões ribossomal 18S e espaçadora ITS (Internal Transcribed Spacer).

O primeiro passo na análise dos genes rRNA em amostras ambientais são a lise das células e extração do DNA e, posteriormente, o DNA é purificado para remoção de substâncias inibidoras das subseqüentes reações enzimáticas. Em seguida, é realizada a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) para amplificação do material genético, usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o grupo de microrganismos de interesse.

As principais limitações metodológicas para estudos genéticos em fungos têm sido a extração do DNA e a amplificação do RNA ribossomal de maneira satisfatória, ou seja, que permita o uso com sucesso dos produtos da amplificação em reações de seqüenciamento e em métodos moleculares comparativos. No caso de fungos

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2005

## Autores

**Christiane Abreu de Oliveira**  
Eng. Agr., Doutoranda da  
UFMG

**Vera Maria Carvalho Alves**  
Eng. Agr., PH.D., Embrapa  
Milho e Sorgo. Caixa Postal  
151 CEP 35701-970 Sete  
Lagoas, MG. E-mail:  
vera@cnpmis.embrapa.br

**Eliane A. Gomes**  
Bióloga. Técnico de Nível  
Superior da Embrapa Milho e  
Sorgo.  
eliane@cnpmis.embrapa.br

**Ubiraci Gomes Paula Lanna**  
Químico. Assistente de  
Pesquisa da Embrapa Milho e  
Sorgo  
ubiraci@cnpmis.embrapa.br

**Nadja M. H. Sá**  
Professora da UFMG

**Ivanildo Evódio Marriel**  
Eng. Agr., Doutor. Embrapa  
Milho e Sorgo.  
imarriel@cnpmis.embrapa.br

crescidos em meios de cultura, a maioria das espécies possui uma grande quantidade de polifenóis e polissacarídeos, que podem ser co-extraídos, gerando impurezas na molécula e interferências na reação de amplificação. O processo de extração também não é tão simples quanto o de bactérias, pois alguns fungos formam estruturas rígidas de resistência e esporos difíceis de serem lisados durante a extração, o que gera, na maioria das vezes, a fragmentação ou a degradação do DNA e perda da qualidade da molécula.

Em resumo, as principais variáveis metodológicas seriam: 1. eficiência na extração do DNA, que depende do tempo de crescimento da cultura de fungos e do método utilizado para extração; 2. a reação de amplificação, ou PCR, que depende da pureza e da qualidade do DNA e do grau de especificidade do "primer", definido em função das seqüências que representam os fungos.

Esse trabalho teve como objetivo descrever uma técnica otimizada de cultivo dos fungos em condições de laboratório para posterior extração do DNA, bem como a metodologia de extração do DNA por utilização de maceração/extração com o kit Fast DNA Q-BIOgene, BIO101 Systems e a amplificação do rRNA de fungos com oligonucleotídeos selecionados em testes.

## Metodologia

### Espécies de fungos

Essa metodologia foi desenvolvida para a extração e amplificação do DNA de alguns fungos isolados do solo de diversas espécies, incluindo gêneros como *Talaromyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Eupenicillium* etc. Esses microrganismos foram obtidos de amostras de solo de rizosfera de genótipos de milho da Embrapa Milho e Sorgo, Sete lagoas, MG e selecionados como fungos solubilizadores de fosfato.

### Cultivo dos fungos para extração do DNA

Os fungos foram cultivados em erlemayers de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido batata – dextrose, sem agitação, à temperatura ambiente por dez dias. Como inóculos, foram utilizados pedaços de massa micelial (<0.5mm) proveniente de culturas puras de

cada espécie de fungo crescidas em placa de petri com meio sólido ágar-batata-dextrose.

Após o crescimento do fungo, o micélio foi filtrado em gaze e seco em papel toalha para retirada do excesso de meio de cultura e submetido ao protocolo de extração. Não houve liofilização do micélio.

### Lise das células e extração do DNA

Cerca de 200 mg do micélio seco em papel toalha foi macerado com nitrogênio líquido em almofarizes de porcelana. Adicionaram-se ao macerado cerca de 20 mg de PVPP (Polyvinyl-polypyrrolidone, Sigma Chemical) para diminuição da interferência de polifenóis e pigmentos. O macerado foi transferido para um eppendorf contendo a matriz de lise composta de sílica e ¼" de esfera plástica do Kit Fast DNA Q-BIOgene, BIO101 Systems. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de lise para fungos (CLS-Y, Q-BIOgene). Os tubos foram homogeneizados no FastPrep Instruments por 30 segundos a uma velocidade de 4,5m/s, conforme ajustes feitos ao protocolo do kit. Para obtenção do pellet, centrifugaram-se os tubos por 10 minutos para precipitação das proteínas e conteúdos celulares. Uma alíquota de 600  $\mu$ L do sobrenadante foi transferida para tubo de microcentrífuga de 2mL limpo, acrescida de 600  $\mu$ L de Binding Matrix (Q-BIOgene) e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação durante 1 minuto, ao invés de lavar uma vez só, como recomenda o protocolo do Kit, lavou-se por 3 vezes a solução com 500  $\mu$ L de SEWS –M (sal-etanol, Q-BIOgene). Todo o conteúdo do etanol foi removido por centrifugação e remoção com micropipeta. Em seguida, utilizou-se 100  $\mu$ L de DES (água ultra-pura) para eluição do DNA da Binding Matrix após incubação durante 3 minutos e centrifugação por 1 minuto.

### Reação de amplificação

Testaram-se vários pares de oligonucleotídeos, sintetizados pela Invitrogen Technologies, das regiões ITS e 18S, citados na literatura para amplificação do DNA de fungos, dentre eles ITS1/ITS4, ITS1/ITS2, ITS3/ITS4, ITS3/ITS2, e da região ribossomal 18S: NS5 x ITS2, NS5 x ITS4. Como o resultado não foi satisfatório com esses pares, ou seja, quase não

ocorreu amplificação da maioria dos gêneros de fungos, testou-se os pares: ITS5 x ITS2; ITS5 x ITS2 e NS1 x NS4.

Finalmente, após os testes, os DNAs de fungos foram amplificados, utilizando-se os seguintes pares de oligonucleotídeos iniciadores selecionados (Figura1): ITS5 – 5'GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G3'; ITS4– 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'; NS1 – 5'GTA GTC ATA TGC TTG TCT C3'; NS4 – 5'CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG3'. Cada 25  $\mu$ L de reação continha tampão de PCR 1X, 2 mM de  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ M de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de oligonucleotídeos iniciadores, 20 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies - Brasil). As condições de amplificação da região ITS de ~ 645 bp utilizando ITS5/ITS4 foram 1' - 94°C, 1' - 50°C, 90" - 72°C durante 40 ciclos; para a região NS de ~ 1152 bp utilizando NS1/NS4 foram usados 40 ciclos de 20" - 94°C, 35" - 55°C, 1' - 72°C; todas as reações foram finalizadas com uma extensão a 72°C por 7 min. Um controle negativo foi feito para cada par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados, onde o DNA da reação foi substituído por água. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 120 V por 1 hora utilizando tampão TAE 1X (90 mM Tris-borato, pH 8.0). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0.5  $\mu$ g/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e gravadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

## Resultados e Discussão

As espécies de fungos utilizadas nos testes desta metodologia foram as de difícil extração do DNA e

amplificação da região ribossomal com diversos oligonucleotídeos iniciadores testados. A metodologia sugerida permitiu a obtenção de um DNA mais puro e de boa qualidade dessas espécies e o uso de oligonucleotídeos iniciadores adequados para a amplificação. A partir dos resultados, várias espécies foram testadas e não houve problemas com a obtenção do DNA e amplificação, o que torna a metodologia abrangente para várias espécies de fungos e principalmente para espécies com alto teor de polifenóis e pigmentos no micélio.

Para a obtenção do micélio para a extração do DNA, ao contrário de outros métodos, optou-se pelo crescimento sem agitação dos frascos contendo o meio de cultura líquido (BDA) e o inóculo de fungos. Verificou-se que esse procedimento favoreceu a extração do DNA, pois não houve formação de estruturas de resistência durante o crescimento, facilitando a lise das células para extração do DNA pelo método da maceração com nitrogênio líquido. A eficiência no processo de lise das células também varia entre os tipos de células dos fungos. Esporos e micélios de hifas têm processos diferentes de lise.

A variação na habilidade para a lise das células para a extração dos ácidos nucleicos pode variar com a idade do micélio. O tempo de dez dias de crescimento em meio líquido foi suficiente para formação de massa micelial em quantidade e idade adequadas para a maceração.

Em métodos convencionais, após a filtração e a secagem do micélio, esse é liofilizado antes do processo de extração. Entretanto, foi observado que, quando liofilizado, o DNA ficou mais degradado (Figura

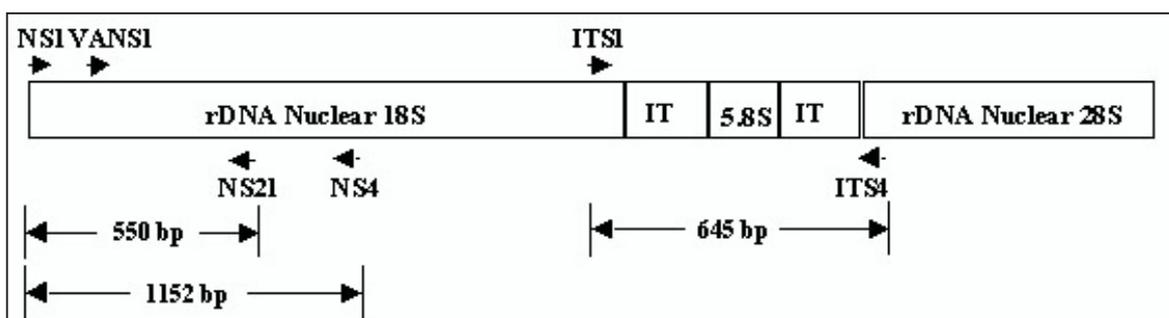


Figura 1. Localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação das diferentes regiões do rDNA de fungos.

2-A) e houve perda da qualidade da molécula em relação à molécula extraída pelo método em questão (Figura 2-B).

No processo de extração, optou-se pela maceração preliminar do micélio com nitrogênio líquido antes da utilização do kit, pois a extração direta com o kit sem maceração prévia resultava em baixo rendimento de DNA na amostra e em dificuldades na amplificação durante a reação de PCR.

Do mesmo modo, a extração do DNA utilizando o kit justifica-se porque quando se utilizou DNA proveniente da extração direta sem a utilização do Kit na reação de PCR, usando as metodologias convencionais de extração, não ocorreu amplificação do DNA em algumas espécies com alta pigmentação do micélio. Provavelmente a resina contida no kit, a Binding Matrix, elimina os efeitos dos pigmentos ou compostos de polifenóis, inibidores da reação de PCR. A contaminação com polissacarídeos e ágar no meio líquido parece ser também suprimida com a utilização dessa metodologia. A contaminação ocorre muitas vezes pela transferência do micélio do meio sólido para o líquido.

Os tempos de homogeneização no FastPrep, centrifugação, lavagem com etanol e outros passos do protocolo do Kit foram ajustados após uma série de testes e resultaram em melhor qualidade e rendimento da extração do DNA.

O uso dos pares de oligonucleotídeos iniciadores ITS5/ITS4 e NS1/NS4 (Figura 3) resultou em amplificação do DNA extraído dos fungos testados. Entretanto, DNAs amplificados com NS1/NS4 mostraram um padrão de amplificação melhor que os DNAs amplificados com ITS1/4. A região ITS do rDNA parece ser mais variável entre espécies de um mesmo gênero ou entre populações, enquanto que as regiões NS (Nuclear Small rDNA) são mais conservadas entre os diversos gêneros. Se a finalidade do trabalho for a identificação de espécies de fungos por seqüenciamento, alguns autores têm recomendado o uso de oligonucleotídeos iniciadores da região ITS. O gene ribossomal 18S providencia boa cobertura das espécies de fungos, mas não o suficiente para análises mais refinadas, como a distinção de estirpes. Isso pode ser obtido pela análise de seqüências obtidas pelos iniciadores da região ITS. Portanto, recomenda-se a amplificação com ITS quando a finalidade for o seqüenciamento e NS quando o material genético for utilizado em testes moleculares como o DGGE, RAPD, ARDRA etc.

## Conclusões

O uso do protocolo descrito permitiu a extração e a obtenção de um DNA de fungos de boa qualidade, integridade e pureza e adequado para amplificação. E os produtos da amplificação foram posteriormente

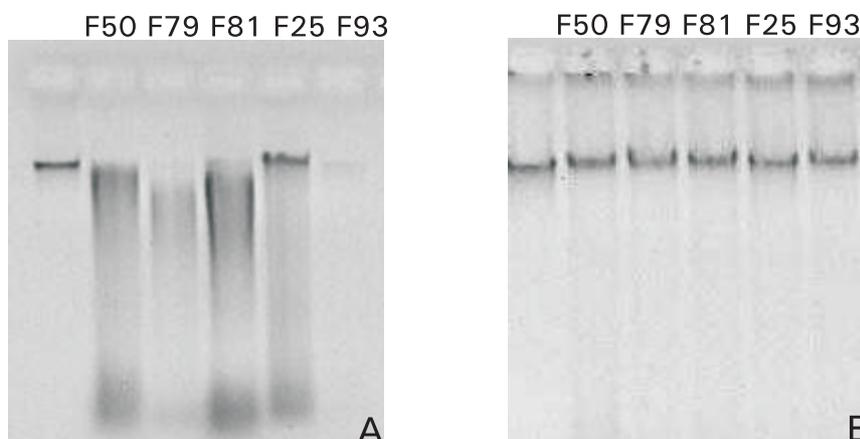


Figura 2. Quantificação do DNA extraído de isolados de fungo (F50, F79, F81, F25, F93) com o uso de um dos métodos convencionais (A) e com o protocolo desenvolvido em questão (B). A letra A corresponde ao marcador de peso molecular de 100ng.

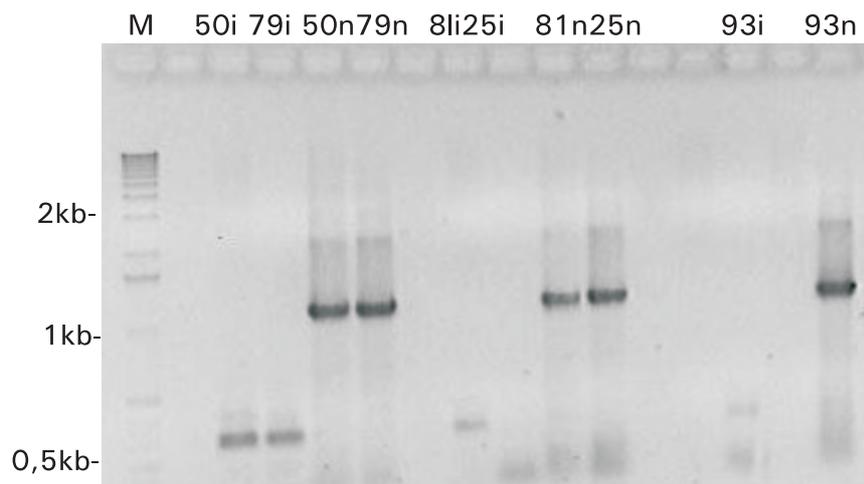


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose, 1,0%, de DNA de isolados de fungo de solo rizosférico amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS5/ITS4 (50I, 79I, 81I, 25I, 93I) e NS1/NS4 (50N, 79N, 81N, 25N, 93N).

submetidos, com sucesso, à análise de seqüenciamento para identificação das espécies de fungos solubilizadores de fósforo isoladas da rizosfera de milho. Essa metodologia pode ser considerada também economicamente mais interessante, porque permite a obtenção de amostras de moléculas de DNA de fungos de maior qualidade, diminuindo erros e repetições na etapa de amplificação, bem como gastos desnecessários com reagentes do PCR e o uso de outros kits adicionais para purificação do DNA obtido, quando comparada aos métodos convencionais disponíveis na literatura.

Pode-se concluir ainda que o uso dos oligonucleotídeos iniciadores da região ITS, ITS5/ITS4 e os da região 18S, NS1/NS4 é recomendável com vantagens em relação aos demais para amplificação do DNA de fungos de gêneros diversos.

### Bibliografia Consultada

AKKERMANS, A. D. L.; ELSAS, J. D. van; BRUIJN, F. J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**, Dordrecht: Kluwer, 1995. Paginação irregular

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular systematics**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 587 p.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 244, p. 9-17, 2002.

SAMARRAI-AL, T. H.; SCHMID, J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, p. 53-56, 2000.

THORN, R. G. The fungi in soil. In: ELSAS, J. D. van; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Moderns soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 63-127.

TREVORS, J. T.; ELSAS, J. D. van. **Nucleic acids in the Environment: methods and applications**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995

VIAUD, M.; PASQUIER, A.; BRYGOO, Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 1027-1032, 2000.

WHITE T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

**Circular  
Técnica, 69**

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

**Endereço:** MG 424 Km 45 Caixa Postal 151 CEP  
35701-970 Sete Lagoas, MG

**Fone:** (31) 3779 1000

**Fax:** (31) 3779 1088

**E-mail:** sac@cnpms.embrapa.br

**1ª edição**

1ª impressão (2005): 200 exemplares

**Comitê de  
publicações**

**Presidente:** *Antônio Carlos de Oliveira*

**Secretário-Executivo:** *Paulo César Magalhães*

**Membros:** *Camilo de Lélis Teixeira de Andrade,  
Cláudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela,  
José Carlos Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro*

**Expediente**

**Supervisor editorial:** *Clenio Araujo*

**Revisão de texto:** *Clenio Araujo*

**Editoração eletrônica:** *Dilermando Lúcio de Oliveira*