

Otimização de métodos de extração de DNA genômico dos basidiomicetos *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88

Hetiene Pereira Marques¹, Félix Gonçalves de Siqueira², André Leão³,
Manoel Teixeira Souza Jr.⁴

Resumo

Este estudo teve como objetivo estabelecer um método de extração de DNA genômico para duas espécies de basidiomicetos (fungos da podridão-branca) *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88. Tendo como premissas para otimização do método características que permeiam a simplificação da extração, rapidez e eficiência, de modo a garantir a qualidade do DNA e, conseqüentemente, a acurácia na construção de bibliotecas de DNA para sequenciamento do genoma de fungos do filo Basidiomycota. Os métodos de extração testados foram fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (CTAB) e dodecil sulfato de sódio (SDS), tendo sido avaliada a interferência dos tipos de cultivos (fermentação submersa – FS ou Fermentação Estado Sólido – FES) para obtenção da biomassa micelial a ser utilizada para a extração do DNA. Os resultados mostram que CTAB foi o melhor método, principalmente para *P. lecomtei* CC40, em que o rendimento foi de 1.506 µg de DNA/g da amostra na condição FS. A FS foi a melhor condição para obtenção de micélio e rendimento de DNA para os dois basidiomicetos avaliados, indicando razão de pureza do DNA de até 1.8, que é o valor mínimo desejado.

Palavras-chave: extração DNA. CTAB. fungos da podridão-branca. SDS.

Introdução

Fungos da podridão-branca compreendem um importante grupo de fungos classificados no filo basidiomycota. Esses fungos são conhecidos pela capacidade de potencializar a biodegradação da biomassa lignocelulósica, como, por exemplo, na obtenção de etanol de segunda geração. Algumas espécies de basidiomicetos apresentam em seu genoma genes ligados a processos de deslignificação, que podem

¹ Bióloga, doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras.
hetiene.marques@colaborador.embrapa.br

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

¹ Biólogo, mestre em Genética e Melhoramento Vegetal, analista da Embrapa Agroenergia, andre.leao@embrapa.br

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia/Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia,
manoel.souza@embrapa.br

facilitar o processo de hidrólise enzimática da biomassa e a obtenção de açúcares fermentescíveis (ROUCHES et al., 2016).

Panus lecomtei CC040 e *Pleurotus pulmonarius* EF88 são dois fungos podridão-branca pertencentes à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Biorrefinaria, da Embrapa Agroenergia. Esses fungos apresentaram potencial biotecnológico para destoxificação de tortas oleaginosas oriundas das sementes de pinhão-mansão e caroço de algodão. Também apresentaram resultados significativos quando cultivados em resíduos da dendeicultura, quanto à geração de enzimas oxidativas e hidrolíticas. Por isso, eles foram selecionados para estudos, visando, inicialmente, à decodificação do genoma completo dos mesmos. Para tanto, há a necessidade de purificação de DNA total em quantidade e qualidade que condizem com a demanda apresentada pelas técnicas modernas de sequenciamento de DNA.

A extração de DNA total de alta qualidade e em quantidade é um passo crítico na construção de uma biblioteca de DNA genômico. Em basidiomicetos são relatadas algumas desvantagens em relação aos métodos de extração de DNA, tais como: (i) o fato de serem demorados, laboriosos e caros, (ii) a necessidade de alta quantidade de amostra, (iii) o baixo rendimento e concentração do DNA, (iiii) a baixa qualidade de DNA (SABARATNAM; VIKINESWARY, 2013).

Neste estudo, o objetivo foi estabelecer dois diferentes métodos de extração de DNA genômico de fungos da podridão-branca, visando à obtenção de DNA total de alta qualidade e em quantidade suficiente para ser empregado em projeto de sequenciamento dos genomas completos dos fungos *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88.

Materiais e métodos

Material biológico

Foram utilizadas duas linhagens de basidiomicetos causadores da podridão-branca, *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88, pertencentes à Embrapa, que estão inclusas na Concessão de autorização de acesso ao patrimônio genético nº 02001.007474/2014-73.

Os fungos foram crescidos em dois sistemas de cultivos: (i) Fermentação Estado Sólido (FES) em batata dextrose ágar (BDA) em placas de petri, incubados a 29 °C por 7 dias e (ii) Fermentação Submersa (FS) em caldo de batata, incubados sob agitação a 120 rpm a 29 °C por 7 dias.

O micélio foi retirado do FES com auxílio de uma pinça estéril, para maceração em nitrogênio líquido. Para a maceração do micélio oriundo da FS, este foi filtrado em discos de papel com filtro de Büchner de porcelana ligado à bomba de vácuo e, posteriormente, lavado com água destilada esterilizada.

Métodos de extração do DNA genômico

Método 1: CTAB-fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

Os micélios macerados dos dois tipos de fermentações (200 mg) foram individualmente colocados em microtubos de 2 mL e adicionado 600 µL do tampão de extração CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Os microtubos foram colocados em banho-maria por 45 min a 65 °C, homogeneizando (vortex) as amostras a cada 10 minutos. Um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionado ao macerado, que fora agitado em vórtex e centrifugado a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante recolhido foi transferido para novos microtubos, aos quais foram adicionados Proteinase K (55 °C por 40 min) e, posteriormente, RNase (10 µg/ml), incubando por 1 h a 37 °C em termobloco. Após essa última incubação, adicionou-se 400 µl de álcool isoamílico. Os microtubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 10 min, e a fase aquosa foi coletada e transferida para novos microtubos, aos quais se adicionou 0,6 volume de isopropanol. Os tubos ficaram 2 horas a -20 °C para precipitação do DNA. Após esse período, o DNA foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min e o *pellet* lavado uma vez com etanol absoluto e outra com etanol 70%. Finalmente, o DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água MiliQ® esterilizada e os microtubos foram armazenados a -80 °C.

Método 2: Dodecil sulfato de sódio (SDS - 10%)

Os micélios macerados dos dois tipos de fermentações (200 mg) foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo 1 mL do tampão de extração SDS 10% (RAEDER; BRODA, 1985). Após a homogeneização por inversão manual os microtubos foram incubados por uma hora a 65 °C em banho-maria. Após esse período, os microtubos foram resfriados para 37 °C, com adição de RNase A (10 µg/m), e incubados por uma hora em termobloco seco a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado em cada microtubo o equivalente a um volume de fenol equilibrado, homogeneizando as fases por inversão manual dos microtubos. Os microtubos foram centrifugados por 10 min a 14.000 rpm a 4 °C e 900 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para novo microtubo de 2 mL. Foi adicionado um volume de fenol:clorofórmio (1:1). Os microtubos foram homogeneizados por inversão manual e centrifugados a 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo de 2 mL, onde foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizando as fases por inversão manual e posterior centrifugação a 14.000 rpm a 4 °C por 10 min. A fase aquosa foi coletada (600 µL), transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, com adição de 0,6 volume de isopropanol para a precipitação dos ácidos nucleicos e centrifugada a 14.000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µL de etanol 70%. O etanol foi descartado e os microtubos secos em termobloco a 50 °C por 15 min. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água MiliQ esterilizada e os microtubos armazenados a -80 °C.

Determinação da qualidade e quantidade de DNA

A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). A concentração do DNA foi registrada em ng/µL, enquanto a pureza foi baseada na razão entre as taxas de

densidade óptica (OD) em um comprimento de onda entre 260 nm e 280 nm. A integridade do DNA de cada método foi determinada por eletroforese em gel de agarose em tampão de corrida TAE1X a 0,7%.

Resultados e discussões

Neste trabalho, foi possível validar o método de extração de DNA genômico, de alto rendimento e de alta qualidade, para as duas espécies de basidiomicetos estudadas. O método CTAB proporcionou melhores resultados para as amostras de DNA extraído de *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88, principalmente quando cultivados por fermentação submersa (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento do DNA genômico dos fungos da podridão-branca *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88 testados em diferentes métodos de extração.

Método	Fungo	Meio de cultivo	Rendimento*	Pureza**
SDS	CC40	FES	18,04	1,60
		FS	88,81	1,94
	EF88	FES	16,57	1,46
		FS	84,05	1,95
CTAB	CC40	FES	107,27	1,81
		FS	1506,06	2,15
	EF88	FES	73,75	1,68
		FS	832,12	2,19

* Rendimento: $\mu\text{g DNA/g}$ amostra; ** Pureza: A260/A280. Cada valor de rendimento e pureza mencionado é a média da triplicata para cada ensaio. Legenda: FES (Fermentação Estado Sólido); FS (Fermentação Submersa).

A diferença no rendimento do DNA genômico entre os meios de cultivos FES e FS ocorreu em virtude da dificuldade da separação do micélio do meio da FES, o que causou perda de micélio e aumento da probabilidade de contaminação por proteínas. Quando cultivado em FS, a separação do micélio e meio de cultivo ocorreu com maior facilidade em função da filtragem e lavagem, não havendo sujidade ou resíduos, melhorando o processo de extração do DNA. Essa situação também foi descrita por (MCCARTNEY et al., 2003), em cujo experimento fungos cultivados em FS apresentaram melhores condições para a obtenção do DNA em relação ao cultivo em FES utilizando ágar.

O rendimento do DNA foi maior para *P. lecomtei* CC40 do que o *P. pulmonarius* EF88 em ambos os métodos avaliados (SDS e CTAB) e nas duas condições de cultivo (FES e FS). No entanto, no método CTAB proporcional, o maior rendimento de DNA na condição FS para os dois fungos, sendo 1.506,06 para (CC40) e 832,12 para (EF88). Isso pode ser explicado pela organização estrutural da membrana e as proteínas que a compõe, pelos microrganismos que podem ser diferentes em função do metabolismo das fontes de carbono e nitrogênio e também pela disponibilidade de oxigênio (ARACHEA et al., 2012).

A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm permite saber a pureza do DNA extraído. Uma razão de 1.8 significa 100% de qualidade. A razão inferior a esse valor indica contaminação de proteínas e a razão superior a 2.0 indica contaminação de RNA. Nota-se na Tabela 1 que alguns valores em ambos os métodos de extração, quando o fungo foi cultivado em FES, foram abaixo de 1.8, enquanto nos cultivos em FS essa razão ficou acima de 1.9.

O método CTAB e a FS, além de ter melhor rendimento do DNA, apresentou melhores resultados na qualidade do DNA, mostrados nas bandas do gel de agarose, como apresentado na Figura 1.

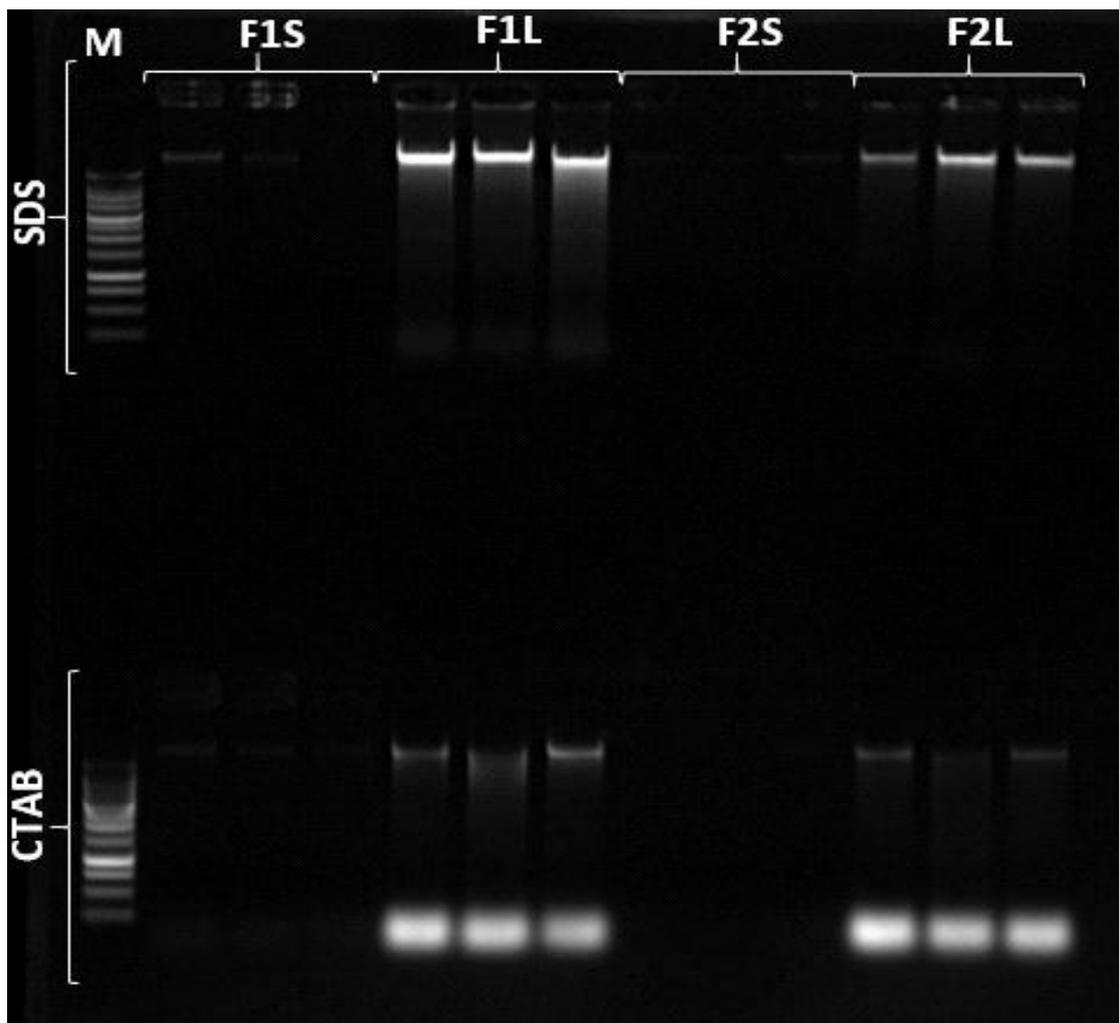


Figura 1. Perfil de extração DNA genômico de *Panus lecomtei* CC40 (F1) *Pleurotus pulmonarius* EF88 (F2), extraído por meio dos métodos SDS e CTAB. As letras S (FES) e L(FS) correspondem a fermentações estado sólido (FES) e submersa, respectivamente. M= Marcador de peso molecular; Lambda/HIDIII.

Em relação à qualidade do DNA, pode-se observar claramente a diferença entre bandas obtidas entre os métodos de extração (Figura 1). A FS apresentou bandas nítidas para os dois fungos avaliados nas triplicatas realizadas nos dois tipos de métodos. A FES não apresentou bandas visíveis ou muito fracas. Isso pode ter ocorrido em função da baixa concentração de DNA da amostra (Tabela 1)

É importante ressaltar, como mostrado na Tabela 1, que houve um rendimento do DNA no protocolo CTAB de até 10 vezes maior do que no método SDS. Assim, no gel de eletroforese foi aplicado 10 μ l de DNA para SDS e 1 μ L de DNA para CTAB. Mesmo com menor quantidade de amostra de DNA no gel, o método CTAB mostrou maior nitidez na formação das bandas (Figura 1). Isso pode ser notado principalmente na FS, tanto para *P. lecomtei* CC40 quanto para *P. pulmonarius* EF88, em que as bandas do DNA estão mais evidenciadas.

Conclusão

O método CTAB obteve melhores resultados de rendimento e qualidade do DNA genômico para *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88. A fermentação submersa apresentou os melhores rendimentos de DNA para ambos os fungos avaliados.

Referências

- ARACHEA, B. T.; SUN, Z.; POTENTE, N.; MALIK, R.; ISAILOVIC, D.; VIOLA, R. E. Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 86, n. 1, p. 12-20, 2012.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- MCCARTNEY, H. A.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 129-142, 2003.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.
- ROUCHES, E.; GIMBERT, I.; STEYER, J-P.; CARRERE, H. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179-198, 2016.
- SABARATNAM, S.; VIKINESWARY. A simple and low-cost technique of DNA extraction from edible mushrooms examined by molecular phylogenetics. **Research on Crops**, v. 14, n. 3, 2013.