

**b-TUBULINA: AVALIAÇÃO DA AMPLIFICABILIDADE DO DNA GENÔMICO
OBTIDOS POR DOIS PROTOCOLOS *IN-HOUSE* DA SEQUÊNCIA
CONSERVADA DA VIA DE BIOSÍNTESE DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE AFLATOXINAS**

**HEMYLSON PORTO¹, EDNA MARIA MORAIS OLIVEIRA², ANDREA MATOS³,
FLÁVIO QUITÉRIO DA CUNHA⁴, OTNIEL FREITAS-SILVA⁵**

-
- 1- Aluno do Curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
hemyilson_souza@hotmail.com
2- Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, DSc., Laboratório de Biologia Molecular
3- Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Biologia Molecular
4- Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Micologia
5- Doutorando da Escola de Engenharia - Universidade do Minho, Portugal
-

ABSTRACT: PORTO, H.; OLIVEIRA, E.M.M.; MATOS, A.; CUNHA, F.Q. b-tubulin: Evaluate of amplificability of genomic DNA from two *in-house* protocols of conserved sequence by biosynthesis pathway of filamentous fungi producers of aflotoxins. In the present study, the polymerase chain reaction (PCR) was evaluated as a molecular technique to identify the aflotoxins filamentous fungi producers. The PCR was carry out using a specific pair of primers for β -tubulin amplification, that has a high conserved sequence in filamentous fungi. It was tested two DNA extraction methods: Lee et al. and Weising et. al. both methods were efficient in DNA isolation. The results showed that using Lee et. al. method was possible to extract DNA with better quality, and the PCR runs presented the expected band for β -tubulin. These results showed that the lee et al. method and PCR is adequate for *Aspergillus sp.* detection. There is a perspective to improve the detection using specific primers to amplify genes related to aflotoxin biosynthesis, allowing the development of a molecular method to evaluate the risk contamination of this substance in food.

Keywords: aflotoxins; PCR; *Aspergillus sp.* e β -tubulin

INTRODUÇÃO

Atualmente, a exportação de produtos brasileiros como o milho, leite, amendoim e castanha-do-brasil, entre outros, tem sido dificultada devido à ocorrência de aflatoxinas acima dos níveis regulamentados. Estas substâncias são sintetizadas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O fato das aflatoxinas serem extremamente perigosas para a saúde, podendo causar até câncer, tem gerado a necessidade de detectá-las por métodos sensíveis. É de grande importância a otimização de técnicas moleculares como a PCR para diagnóstico de fungos produtores da toxina (OLIVEIRA e GERMANO, 1997; KUMEDA e ASAO, 2001). Com esta metodologia pode-se avaliar o risco potencial de um determinado alimento apresentar contaminação futuramente, devido à identificação precoce do organismo produtor. O objetivo do presente trabalho foi a avaliação da amplificabilidade do DNA genômico, do *A. flavus* e *parasiticus* obtidos através de protocolos *in-house*, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para região conservada de fungos produtores de aflatoxinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e cultivo dos fungos filamentosos. *Aspergillus flavus* e *Aspegillus parasiticus* foram isolados de castanha-do-brasil, em meio AFPA sólido (25°C, durante 7 dias), repicados e cultivados em meio Czapek sólido (10 a 15 dias, a 25°C).

Extração de DNA. Foram testados dois métodos de isolamento do DNA: o de Weising et. al (1995) e o de Lee et. al (2004).

Protocolo Lee et al.: Pesou-se analiticamente 50mg de micélio, em tudo do tipo *Eppendorf* de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 0,6 mL do tampão de extração, com SDS 2%. O DNA foi purificado com uma solução fenol/clorofórmio (1:1) e CIA (24:1). Após a purificação, o DNA em solução é precipitado com isopropanol. Um tratamento adicional é realizado com RNase e o DNA obtido é ressuspendido em 50 µL de água.

Protocolo Weising et al: Pesou-se analiticamente 150mg de micélio, em tudo do tipo *Eppendorf* de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 0,6 mL do tampão de extração, SDS 0,5%. O DNA foi purificado com uma solução acetato de sódio 3M. Após a purificação, o DNA em solução é precipitado com isopropanol e ressuspendido em 100 µL de água.

PCR. Utilizou-se o kit comercial PCR SuperMix Invitrogen para volume final de reação de 50 µL (45µL do Mix, 1µL de cada primer e 3µL de DNA). Os oligonucleotídeos utilizados foram o tub 440 5'GGTAACCAAATAGGTGCCGCT3' e o tub 1740 5'TAGGTCTGGTTCTTGCTCTGGATG3', específicos para a amplificação do gene β -tubulina, gerando um fragmento de 1300 pb. As condições de ciclagem foram as seguintes: 1 ciclo inicial de 5 min à 95°C; 40 ciclos da seqüência 30s/95°C – 30s/63°C – 60s/72°C; e 1 ciclo final de 10 min à 72°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos descritos por Lee et al. e Weinsing et al. para extração de DNA genômico se mostraram eficientes para *A. flavus* e *A. parasiticus*, embora o método de Lee et al. tenha apresentado maior rendimento em DNA (SOUZA et. al., 2007).

Dependendo do tempo de cultivo em Czapeck, a extração de DNA de *A. flavus* pode ser dificultada devido às estruturas de resistência, os cleistotécios. Assim, a coleta do micélio para a extração do DNA foi realizada antes da formação destas estruturas.

Embora o isolamento de DNA usando o método de Weising et. al. tenha alcançado êxito, a PCR destes isolados não apresentou fragmentos amplificados. Já a PCR com as amostras isoladas pelo método de Lee et. al., apresentou fragmento de 1300 pb para a β -tubulina, tanto em *A. flavus* quanto em *A. parasiticus* (figura 1).

Estes resultados mostraram que o método de Lee et. al. é o indicado para extração de DNA e posterior PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para a via de biossíntese de aflatoxinas.



Figura 1. Resultado da PCR (DNA extraído com método Lee et al.): **P** - padrão de peso molecular (*low mass*); **1** – fragmento de 1300pb de *A. flavus*; **2** - fragmento de 1300pb de *A. parasiticus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KUMEDA, Y. e ASAO, T. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* Section *Flavi* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 67, n. 9, p. 4084-4090, 2001.
- LEE, C.-Z., LIOU, G.-Y., YUAN, G.-F. Comparision of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, Taiwan, v.45, p. 61-68, 2004.
- OLIVEIRA, C.A.F. & GERMANO, P.M.L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Saúde Pública**, v. 31, n. 4, São Paulo, 1997.
- SOUZA, H.P., MATOS, A., OLIVEIRA, E.M.M., CUNHA, F.Q., SANTOS, K.D., FREITAS-SILVA, O. Métodos de extração de DNA genômico de fungos filamentos produtores de aflatoxinas. **Anais Eletrônico do Encontro Nacional de Analistas de Alimentos** (ENAAAL), 2007.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLF K., MEYER, W. DNA fingerprinting in plants fungi. **Boca Raton: CRC Press**, p. 322, 1995.