

ANÁLISE GENÔMICA DO DNA PELA TÉCNICA DE RAPD (*RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*) DE MICRORGANISMOS ISOLADOS COM POTENCIAL CAROTENOGÊNICO

Lídia Tiggemann, Jamile Zeni, Geciane Toniazco, Carine Cence, Rosicler Colet, Rogério L. Cansian, Eunice Valduga*

Laboratório de Biotecnologia, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus Erechim

**Email: veunice@uricer.edu.br*

RESUMO

No *Screening* de microrganismos de amostras de resíduos agroindustriais e solos foram isolados e selecionados 116 microrganismos, sendo 16 leveduras (5 carotenogênicas), 65 bactérias (19 carotenogênicas) e 35 fungos (5 carotenogênicos). A análise genômica do DNA pela técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) foi realizada com o objetivo de verificar possíveis duplicações de cepas. Os microrganismos produtores de carotenóides foram submetidos a extração de DNA e realizada análise por RAPD. Com a análise de RAPD não foi possível agrupar os microrganismos em espécies ou gêneros, ou seja, não indicando duplicações de cepas.

Palavras- chave: *Screening*, resíduos agroindustriais, carotenóides, RAPD.

1 INTRODUÇÃO

O *screening* de microrganismos implica na seleção de cepas duplicadas e devido ao grande número de microrganismos selecionados existe a dificuldade de identificação dos mesmos. Para obter um processo de *screening* mais eficiente, têm-se utilizado técnicas de biologia molecular (GUTHRIE *et al.*, 1992; HARRY *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 1991). A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem-se mostrado extremamente útil para medir e caracterizar a variabilidade genética. A irrestrita adoção de marcadores moleculares do tipo RAPD na detecção, diagnóstico e determinação da diversidade genética deve-se, principalmente, a sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos

resultados gerados. Além disso, o RAPD é uma técnica simples que requer pequenas quantidades de DNA, não sendo necessário o conhecimento prévio do genoma, sendo o nível de regiões polimórficas geralmente alto (WILLIAMS *et al.*, 1991). Sendo assim, esta tem sido considerada uma das técnicas mais viáveis para uso rotineiro, devido a sua rapidez e simplicidade na detecção de variabilidade genética, especialmente em organismos haplóides, como é o caso dos fungos (FUNGARO, 2000).

A análise genômica do DNA pela técnica de RAPD dos microrganismos selecionados e isolados para a bioprodução de carotenóides, foi realizada com o objetivo de verificar possíveis duplicações de cepas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Isolamento e seleção de microrganismos

As leveduras, bactérias e fungos filamentosos coloridos utilizados para extração de DNA foram selecionados de amostras de frutas (laranja, mamão, ameixa preta, pêssigo, maçã, melão, goiaba, banana), casca de uva, solo de videiras, kiwi, solo de kiwi, chás, folhas de laranjeiras e eucaliptos, produtos processados em decomposição e farinhas de trigo. No *Screening* de microrganismos foram isolados e selecionados 116 microrganismos, sendo 16 leveduras (5 carotenogênicas), 65 bactérias (19 carotenogênicas) e 35 fungos (5 carotenogênicos).

2.1.2 Extração de DNA e seleção de *primers*

A extração do DNA dos fungos filamentosos, leveduras e bactérias foi baseado no método de Roeder & Broda (1987). As culturas foram crescidas em meios YM e maceradas. A 300mg foi adicionado 700 μ L de tampão (3 %, v/v) SDS, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 % (v/v) β -mercaptoetanol). Cada amostra foi incubada por 1h a 65 °C. A desproteinização foi feita com igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) e centrifugada a $21.467 \times g$ por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes. Após isto, foram adicionados 120 μ L de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 600 μ L de isopropanol

gelado. O conteúdo foi incubado em *freezer* por 30 minutos e centrifugado por 5 minutos a $21.467 \times g$. O pellet foi lavado duas vezes com 500 μL de etanol 70 % e deixado secar. A seguir foi ressuspensa em 200 μL de tampão TE.

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro UV a 260 nm e confirmação da pureza e integridade em espectrofotômetro UV a 280 nm (proteína) (Agilent 8453) e em gel de agarose 0,8 % (Gibco BRL) em TBE 1 X (0,89 M Tris, 0,89 M de H_3BO_3 e 0,08 M EDTA). Fez-se as diluições visando obter uma concentração final de DNA de 10 ng/ μL .

2.1.3 Reação de amplificação de RAPD

Foi utilizada a reação descrita por Williams *et al.* (1991), com algumas modificações. Para um volume total de 25 μL : tampão de reação (50mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl), dNTPs (200 mM de cada), 0,2 mM de *primer*, 3 mM de MgCl_2 , 0,25 mM de Triton-X-100, 1,5 U (unidades) de Taq DNA *polymerase recombinant* da Invitrogen (*Life Technologies*, São Paulo, Brasil) e aproximadamente 40 ng de DNA (4 μL de amostra).

Foram testados kits da OPA, OPF, OPH, OPW e OPY obtidos da Operon Technologies, com 20 *primers* cada um, para identificar os *primers* que mostraram os melhores resultados, tomando-se como base o número, intensidade e tamanho das bandas. A reprodutibilidade e o polimorfismo gerado também foram considerados para selecionar os kits.

2.1.4 Amplificação de RAPD

A amplificação foi realizada em termociclador MJ Rsearch Inc., Watertown, MA (modelo PTC100TM *Programmable Thermal Controller*). O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 minutos a 92 °C, 40 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto a 35 °C e 2 minutos a 72°C. Em seguida, 3 minutos a 72 °C e resfriamento a 4 °C até a retirada das amostras.

2.1.5 Análise eletroforética dos fragmentos amplificados

A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4 % em tampão TBE 1X em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de

90 Volts durante 3 horas. A coloração dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (*Media Cybernetics, Silver Spring, MD*).

2.1.6 Análise dos dados

Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional NTSYS versão 1.7 (Rohlf, 1992) (Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System). Os dendrogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), desenvolvido por Sokal & Michener (1958), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard.

2.2 Resultados e Discussão

Devido à dificuldade de identificação morfológica, tanto dos fungos como das bactérias e leveduras isolados e selecionados neste trabalho, procedeu-se uma análise genética através de marcadores moleculares RAPD, visando-se identificar possíveis duplicações de cepas dos microrganismos isolados e selecionados como produtores de carotenóides. Neste sentido, os microrganismos produtores de carotenóides foram divididos em dois grupos, os de pigmentação rósea e amarela, analisando-se separadamente bactérias e fungos.

Inicialmente foi realizada a seleção de *primers* para posterior análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), onde foram testados 40 *primers* pertencentes aos kits de *primers* randômicos OPA, OPH, OPW e OPY da OPERON *Technologies*, escolhidos aleatoriamente.

Foram considerados para a análise 8 *primers*, para os fungos e as bactérias de coloração rósea, sendo observado 98 e 81 fragmentos com número médio de fragmentos por *primer* de 12,25 e 10,12, respectivamente. Pode-se observar um alto polimorfismo entre os microrganismos de coloração rósea analisados com 72,4 % e 81,48 %, respectivamente.

O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre os fungos e bactérias de coloração rósea variou entre 0,52 e 1,0 com média de 0,76 entre os mesmos. Este resultado indica a existência de uma alta variabilidade entre as cepas, demonstrando tratar-se de espécies ou até gêneros distintos.

Para os fungos e as bactérias de coloração amarela foram considerados para a análise 7 *primers*, sendo observado 94 e 63 fragmentos, com número médio de fragmentos por *primer* de 13,42 e 9 pode-se observar um alto polimorfismo entre os microrganismos de coloração amarela analisados 79,78 % e 92,06 %, respectivamente.

O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre os fungos e bactérias produtores de carotenóides de coloração amarela estudados neste trabalho variou entre 0,4 e 1,0 com média de 0,70 entre os mesmos. Este resultado indica a existência de uma alta variabilidade entre as cepas, indicando tratar-se de espécies ou até gêneros distintos.

As Figuras 1 e 2 apresentam os dendrogramas obtidos para os microrganismos produtores de carotenóides de coloração rósea e amarela respectivamente. Analisando-se os dendrogramas observa-se um alto polimorfismo, este resultado é importante, pois evita a duplicação dos trabalhos nas etapas de otimização de produção e de purificação dos biocompostos.

Nos dendrogramas apresentados na Figura 1a e 1b, foram analisados os microrganismos produtores de carotenóides de coloração rósea incluindo microrganismos de coloração amarela e branca, com o intuito de verificar alguma semelhança genética entre microrganismos de coloração diferente.

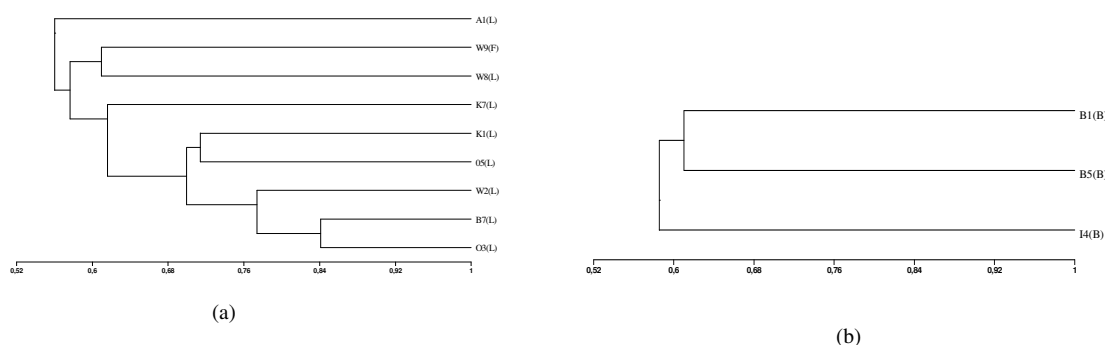


Figura 1 - Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD dos fungos (a) e bactérias (b) isolados de coloração rósea utilizados para a bioprodução de carotenóides.

Nos dendrogramas apresentados nas Figuras 2a e 2b, foram analisados os microrganismos produtores de carotenóides de coloração amarela incluindo microrganismos de coloração rósea e branca, com o intuito de verificar alguma semelhança genética entre microrganismos de coloração diferentes.

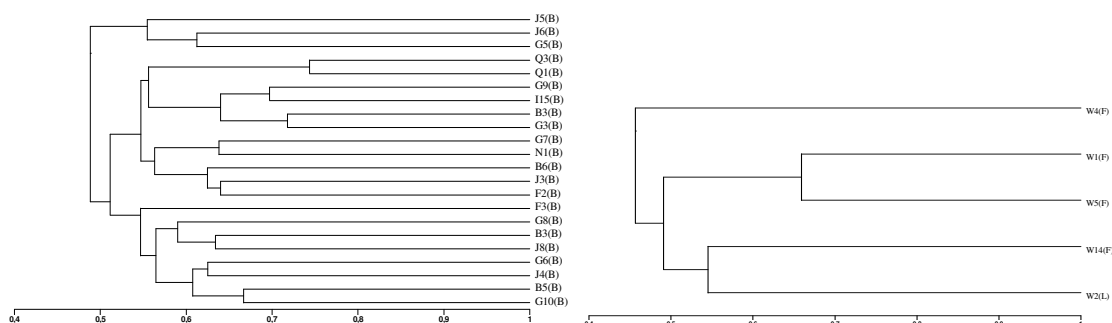


Figura 2 - Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD das bactérias (a) e dos fungos (b) isolados de coloração amarela utilizados para a bioprodução de carotenóides.

3 CONCLUSÃO

Com a análise de RAPD não foi possível agrupar os microrganismos em espécies ou gênero para os microrganismos produtores de carotenóides.

REFERÊNCIAS

- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. *Biotechnology: Ciência e Desenvolvimento*, v. 3, p. 12 - 16, 2000.
- GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL C. W.; FREDERIKSEN, R. A. and ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, v. 82, p. 832 - 835, 1992.
- HARRY, M; JUSSEAUME, N.; GAMBIER, B. and GARNIER-SILLAM, E. Use of RAPD markers for the study of microbial community similarity from termite mounds and tropical soils. *Soil Biology Biochemistry*, v. 33, p. 417 - 427, 2001.
- WILLIAMS, M.N.V.; PANDE, N.; NAIR, S.; MOHAN, M. & BENNETT, J. Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theoretical Applied Genetics*, v. 82, p.489-498, 1991.