

PCR na Micologia

Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Professora Associada do
Departamento de Biologia Geral
Universidade Estadual de Londrina
mbpfunga@carpa.ciagri.usp.br

Fotos cedidas pelo autor

Diagnóstico e Análise de Variabilidade

A PCR é uma técnica, descrita em meados da década de 80, por Mullis e colaboradores (Mullis & Faloona, 1987), que permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA. A obtenção de segmentos amplificados normalmente obedece às seguintes etapas: a) extração de DNA molde, isto é, que contém a região a ser amplificada, b) escolha do segmento a ser amplificado e obtenção de *primers* específicos para o reconhecimento desse segmento, c) amplificação que dará origem a várias cópias, fazendo-se uso de um ciclador térmico e, por fim, d) leitura do produto amplificado após eletroforese e coloração. Devido à sua especificidade e sensibilidade, a PCR é um método importante para a diagnóstico de fungos. Existem vários exemplos de testes baseados em PCR desenvolvidos para a detecção de fungos em plantas, alimentos e em patologia médica. A PCR pode ser utilizada para detectar grupos de linhagens, patotipos, espécies ou taxa superiores.

Existem vários protocolos que permitem a extração de DNA, alguns mais laboriosos e outros mais simplificados. Para fins de PCR é possível utilizar métodos rápidos e simplificados, uma vez que essa técnica requer quantidades mínimas de DNA e este não precisa apresentar alto grau de pureza, podendo ser extraído a partir de amostras de ambientes complexos,

tais como solos, rios e açudes, alimentos e amostras clínicas.

Para a detecção de um dado fungo em qualquer tipo de amostra é necessário se ter *primers* que propiciem a amplificação de um gene ou segmento específico daquela espécie ou daquela função que se deseja identificar. Assim, o desenvolvimento de procedimentos de diagnóstico baseados em PCR requer o conhecimento de seqüências de nucleotídeos de pelo



Figura 1. Estrutura do *cluster* gênico que codifica RNA ribossômico

menos parte da região alvo a fim de que *primers* específicos possam ser desenhados. Neste sentido, algumas regiões tais como aquelas que codificam para RNA ribossômico têm sido bastante úteis.

O DNA que codifica para RNA ribossômico apresenta-se como um *cluster* gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S (Figura 1). Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico

maduro. O *cluster* gênico que codifica para RNA_r aparece repetido centena de vezes no genoma fúngico. O fato desse *cluster* gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos. A região 18S, por exemplo, é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de seqüências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos. A utilização de programas computacionais que permitem a comparação destas seqüências de organismos alvos e não alvos, permite definir regiões apropriadas para a síntese de *primers* a serem utilizados para detectar uma dada espécie de fungo. A PCR realizada com *primers* que são suficientemente homólogos para permitir a amplificação dos organismos alvos, mas que por outro lado não pareiam com organismos não alvos, permitirá a detecção específica do que se deseja. As seqüências de DNA que são polimórficas, ou seja freqüentemente

variáveis, entre espécies fúngicas, tais como as seqüências ITS, são boas candidatas para a detecção de uma espécie e exclusão de todas as demais. Por exemplo, diferenças na região ITS têm sido usadas para desenvolver testes, baseados em PCR, para o diagnóstico de fungos causadores de micose na espécie humana, produtores de toxinas em amostras de alimentos, bem como patógenos de plantas, sem o prévio isolamento do fungo. Devido as seqüências de DNAr estarem presentes em grande número de cópias no genoma, faz com que se tenha alta sensibilidade no diagnóstico via PCR.

O fato de que algumas impurezas presentes na amostra de DNA podem, eventualmente, inibir a ação da DNA polimerase, exige-se cautela com resultados falso negativos. Em função disso, é aconselhável o uso de um par de *primers*, que atue como controle da qualidade da reação. Ou seja, além dos específicos para o gene que se deseja diagnosticar, também devem ser incluídos na reação *primers* que reconheçam um gene universal. Normalmente se usa um par de *primers* que reconhece uma região altamente conservada do *cluster* gênico que codifica RNA ribossômico. Assim, se a reação de PCR estiver funcionando o produto de amplificação do segmento universal será detectado em qualquer amostra que contenha biomassa fúngica.

Uma estratégia importante que tem sido realizada para aumentar o poder de detecção de certos microrganismos em amostras de alimentos, animais ou plantas é o uso da NESTED-PCR (Figura 2). Esta técnica, que nada mais é que uma PCR em duas etapas, é útil quando impurezas que inibem a amplificação do DNA estão presentes nas amostras ou quando a quantidade de DNA do agente que se deseja detectar é muito pequena. A estratégia para diminuir problemas relacionados a impurezas é diluir, consideravelmente, a amostra que contém o DNA molde e conseqüentemente as impurezas que inibem a *Taq* polimerase. Em conseqüência do baixo número

de moldes iniciais, a quantidade de segmentos amplificados não será suficientemente visível em gel de agarose. No entanto, o produto da amplificação obtido ao final desta primeira etapa pode ser usado como molde para a realização de uma segunda PCR (NESTED-PCR). Este procedimento permitirá, agora, a obtenção de um número suficiente de cópias para visualização em gel de agarose. A NESTED-PCR é igualmente apropriada para detectar a presença de microrganismos que estão ocorrendo em baixa

diagnóstico destas infecções são demorados e pouco sensíveis. A inabilidade ou demora no diagnóstico da infecção fúngica adia a administração de terapia apropriada, o que traz sérias implicações para o prognóstico do paciente. Dentro deste contexto, o uso de métodos de diagnóstico de micoses sistêmicas que sejam fidedignos e rápidos é imperativo para melhorar a taxa de sobrevivência de pacientes imunodeprimidos. Métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em PCR, têm sido adotados

na tentativa de melhorar a sensibilidade e a especificidade, e de diminuir o tempo requerido para o diagnóstico destas infecções. Jang-Jih (1995) demonstrou a alta especificidade e sensibilidade da NESTED-PCR para a detecção do fungo *Pneumocystis carinii* em amostras de lavagem bronqueoalveolar. Utilizando-se os *primers* 5'AAG-TTGATCAAATTTGGTC3' e 5'CTCGGACGAGGATCCTCG-CC3'' na primeira etapa de amplificação da região ITS do DNA ribossômico e 5'CGTAGGTGACCTGCGAAGGATC3' e 5'GT-TCAGCGGGTGATCCTGCC-

TG3' na segunda amplificação, obteve-se o produto de amplificação esperado em 30 amostras sabidamente positivas, ou seja 100% de eficiência. Este estudo mostrou também a eficiência do método no que diz respeito à sensibilidade, pois resultados positivos foram obtidos em amostras contendo DNA correspondente a apenas 3 células fúngicas. Esta metodologia que faz uso de *primers* baseados em seqüências de nucleotídeos de DNAr tem sido otimizada visando a utilização para diagnóstico de vários outros fungos de importância médica, entre eles, espécies dos gêneros *Trichosporum*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Candida*.

Em tempos de globalização da economia, aspectos gerais de qualidade e principalmente higiênico-sanitários são fundamentais na definição da aceitação e da recomendação de quaisquer produtos, especialmente os destinados à alimentação humana. A ocorrência de fungos como contaminantes em produtos agrícolas, alimentos e rações, tem sido assunto de investiga-



Figura 2. NESTED-PCR. a) O produto da PCR realizada a partir de um baixo número de moldes iniciais não é visível em gel de agarose corado com brometo de etídeo (a última canaleta é uma reação controle), b) Bandas são observadas após uma segunda PCR, utilizando-se como molde o produto da amplificação obtido na primeira reação

freqüência na amostra em investigação. Este tipo de PCR em duas etapas chega a ser 1.000 vezes mais sensível que a PCR única.

O uso de terapias que debilitam o sistema imune, tal como a quimioterapia utilizada para o tratamento de câncer e o crescente surgimento de pacientes com AIDS têm proporcionado, recentemente, um aumento significativo de indivíduos imunossuprimidos, os quais estão altamente sujeitos a infecções fúngicas sistêmicas. Salvo raras exceções, os métodos de

Tabela 1. Condição ótima de reação visando a detecção de polimorfismos de RAPD em *Metarhizium anisopliae* (Fungaro e Vieira, 1998).

Reagentes	Volume em μL	Concentração do estoque	Concentração final
Água ultra-pura	8,7	—	—
Tampão (100mM Tris-HCl pH 9,0, 15 mM MgCl_2 e 500 mM KCl)	2,5	10 X	1 X
dNTPs	4,0	1,25 mM	200 μM
primer	2,5	4 μM	400 nM
MgCl_2	3,0	12,5mM	1,5 mM*
Taq polimerase	0,3	5U/ μL	1,5 U
DNA	4,0	5ng/ μL	20 ng

A concentração final de MgCl_2 na reação será 3,0 mM, pois mais 1,5 mM advém do tampão.

ção de vários grupos de pesquisa. Estima-se que 25% da produção anual de alimentos derivados de plantas são deteriorados por fungos. Grande parte dos fungos que contaminam alimentos produz micotoxinas, as quais são metabólitos secundários que prejudicam a saúde humana e animal. Essa situação demonstra a importância de se usar métodos apropriados para controlar o status micológico dos produtos alimentares. As técnicas tradicionais para a identificação de fungos toxigênicos em alimentos são pouco sensíveis, dependentes de cultivo e detectam apenas a presença de células viáveis. Ao contrário disso, o uso da PCR permite diagnosticar, de forma sensível e específica, estes microrganismos, mesmo que se encontrem inviáveis. Diante disso, recentemente, várias pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de viabilizar a detecção de fungos toxigênicos em alimentos através da PCR.

Para fungos toxigênicos, os alvos a serem amplificados são, quando possível, seqüências de genes que codificam enzimas que participam da via biossintética das micotoxinas (genes estes ditos: “genes da biossintese de micotoxinas”). Entretanto, até o momento, somente alguns destes genes foram clonados e sequenciados. As únicas vias biossintéticas bem caracterizadas são aquelas da biossintese de aflatoxinas, trichothecenos, patulina, toxina PR e da esterigmatocistina (Geisen, 1998). Seqüências alvo ditas em-

píricas, ou seja, aquelas que não pertencem a genes da biossintese de micotoxina, mas que sua presença está associada somente a linhagens com habilidade de produzir a micotoxina também vêm sendo utilizadas para a detecção destes fungos. Uma das formas que vêm sendo utilizadas para se chegar a este tipo de seqüên-

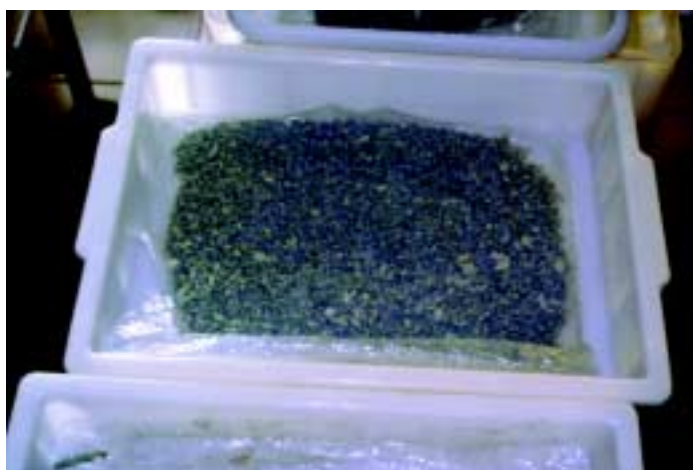


Figura 3. Produção de *M. anisopliae* (gentilmente cedida por Sosa-Gomez, D.R / Embrapa/soja)

cia é através da análise comparativa de perfis de RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso) de materiais toxigênicos e não-toxigênicos.

Visando investigar a potencialidade da PCR para detectar fungos aflatoxigênicos em farinha de milho, Shapira *et al.* (1996) inocularam neste alimento seis espécies diferentes de fungos, quatro não toxigênicas e duas toxigênicas. Em seguida, o DNA foi extraído da mistura fungo-farinha e a PCR foi realizada com primers que

reconhecem genes que participam da via biossintética da aflatoxina. Produtos de amplificação foram detectados somente em amostras nas quais as espécies aflatoxigênicas, *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus*, haviam sido inoculadas demonstrando a especificidade do método. Alta sensibilidade também foi observada, pois resultados positivos foram obtidos para amostras inoculadas com 100 esporos por grama e 24 horas de incubação.

Atualmente, a PCR também vem sendo utilizada para a detecção de patógenos vegetais com o objetivo, entre outros, de evitar sua disseminação via a introdução de material vegetal contaminado. Desta forma, o desenvolvimento de primers que permitam a detecção de fungos fitopatogênicos tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores. Um exemplo interessante do uso da PCR para detecção de patógeno vegetal é aquele descrito para *Colletotrichum acutatum* por pesquisadores da Universidade de Belfast, UK (Screenivasaprasad *et al.* 1996). Este fungo é um patógeno de moranguinho, que causa uma doença denominada antracnose. Dada a severidade desta doença, o Reino Unido exige que toda planta de morango proveniente de outros países da Comunidade Européia seja testada quanto à presença deste patógeno.

As plantas a serem introduzidas devem permanecer estocadas em câmara fria, de forma segura, até que se tenha o resultado do teste de sanidade. O tempo necessário para a obtenção dos resultados pelo método tradicional é longo, o que leva à perda de vigor das plantas enquanto estocadas, inviabilizando seu comércio. A necessidade de diminuir o tempo de estocagem das plantas em análise levou estes pesquisadores a desenvolver primers para amplificação de regiões ITS, específicas para *C. acutatum* a partir de plantas de morango. Esta alternativa metodológica é particularmente importante para o diagnóstico de fitopatógenos de difícil cultivo e/ou identificação.

Análise de Variabilidade Genética

Baseando-se no princípio da PCR, Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990) descreveram uma classe de marcadores moleculares, os RAPDs, extremamente útil para medir e caracterizar a variabilidade genética.

O RAPD envolve a amplificação de regiões anônimas dispersas pelo genoma. Nesta técnica, não se escolhe *a priori* a região a ser amplificada, ao contrário disso, utilizam-se *primers* de seqüências arbitrárias de bases e analisam-se os produtos amplificados. Além de não ser usados *primers* específicos, os produtos de amplificação são obtidos a partir de uma única seqüência iniciadora. Esta ocorrerá quando coincidir da mesma seqüência *primer* reconhecer um sítio de homologia em uma das fitas e também reconhecer o mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo limite da PCR.

O tamanho do *primer* de RAPD é menor (normalmente, 10 nucleotídeos) do que aquele utilizado na PCR específica, justamente para aumentar a chance de haver sítios complementares ao *primer* dentro do intervalo limite da PCR. Os *primers* são utilizados, um a um, para detectar diferenças entre os genótipos. Ao final do trabalho, no entanto, os dados obtidos com os diferentes *primers* devem ser analisados em conjunto. A condição ótima da reação de RAPD pode variar de organismo para organismo, de maneira que a condução de experimentos visando a otimização da técnica é importante. A concentração de DNA genômico é a variável mais importante a ser padronizada. O excesso de DNA pode reduzir ou inibir significativamente a atividade de polimerização da enzima Taq polimerase devido a altas concentrações de impurezas, resultando na ausência de amplificação. Por outro lado, o DNA em concentração muito baixa pode dar origem a padrões de ampli-

cação não reprodutíveis, podendo ocorrer acréscimo ou diminuição de bandas, mesmo entre repetições. Felizmente, ao contrário do que ocorre para muitas espécies vegetais, para a maioria dos fungos o espectro de concentração de DNA que permite obter perfis de RAPD é amplo. Bueno-Gomes (2000) mostrou que para *Penicillium chrysogenum*, concentrações de DNA variando de 0,03 a 300ng permitem a obtenção de perfis de RAPD. Amostras contendo entre 0,3 e 30ng de DNA dão origem a padrões idênticos de RAPD. Entretanto, este trabalho mostrou haver um leve comprometimento na reproducibilidade, quando concentrações extremas de

das com os diferentes *primers*, tem-se desta forma um grande número de locos a serem analisados. A presença de um fragmento amplificado em alguns dos genótipos comparado com a ausência desse mesmo fragmento em outros genótipos, caracteriza o que se denomina polimorfismo de RAPD. Estes polimorfismos têm sido extremamente úteis para estudos de variabilidade genética. Em nosso laboratório, na Universidade Estadual de Londrina, temos utilizado o RAPD para caracterizar a variabilidade genética de várias espécies fúngicas, particularmente aquelas de interesse para o controle biológico de pragas da agricultura.

O interesse pelo uso de microrganismos para o controle de pragas da agricultura vem aumentando nos últimos anos, principalmente a partir da década de 70, à medida que foram sendo evidenciados os problemas advindos da utilização dos inseticidas químicos. Entre os exemplos de fungos disponíveis no mercado e daqueles que ainda estão em desenvolvimento no país, para diferentes culturas encontram-se os gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Nomurae* e *Entomophthora*.

Apesar do Brasil ser um país que se destaca pelo número de pesquisadores que trabalham com controle microbiano de pragas, ainda são poucas as informações existentes sobre a variabilidade genética de espécies de fungos entomopatogênicos isolados em nosso país. O conhecimento da variabilidade genética dessas espécies é de grande importância para a realização de estudos genéticos e desenvolvimento de programas de melhoramento.

Entre as principais pragas das pastagens no Brasil encontram-se os gêneros *Deois*, *Zulia* e *Mahanarva*. Estas cigarrinhas, altamente fitotoxigênicas, reduzem a produção de massa verde em cerca de 15% e, em consequência, danificam uma área foliar que poderia alimentar milhões de bovinos por ano. O controle dessas cigarrinhas, que pode chegar a 60%, repre-



Figura 4. Morfologia das colônias dos isolados Ma2 e Ma3 de *M. anisopliae* (gentilmente cedida por Sosa-Gomez, D.R / Embrapa/soja)

DNA, tais como 0,03 e 300ng, são utilizadas na reação. A título de exemplo, a Tabela I mostra as condições de amplificação que freqüentemente utilizamos em nosso laboratório.

Antes do advento dos marcadores moleculares, a caracterização de isolados fúngicos era restrita, principalmente, a de marcadores morfológicos. A caracterização morfológica, embora útil, é bastante limitada devido ao baixo número de caracteres passíveis de serem analisados. Em fungos em média cada *primer* gera 10 segmentos amplificados, com peso molecular variando de 300 a 2500 pb. Ao serem totalizadas as bandas obti-

senta um bom exemplo da utilização prática do fungo *Metarbizium anisopliae* (Figura 3 e 4). Uma ilustração da análise de variação genética de *M. anisopliae* isolados de solo e de cadáveres da cigarrinha *Deois flavopicta*, utilizando-se de RAPD, é apresentada na Figura 5. Entre os 13 isolados analisados, 6 foram coletados em diferentes regiões do Brasil e estavam colonizando o inseto; os demais isolados provieram do solo de uma única região do Estado do Paraná, Mauá. Os resultados mostraram que a diversidade entre isolados obtidos de *D. flavopicta* é muito menor que aquela encontrada entre isolados do solo. Este é um exemplo da importância do emprego do método de RAPD no entendimento da relação patógeno-hospedeiro (Fungaro *et al.* 1996)

Estudos realizados pelo Cenargen/Embrapa demonstraram que o fungo *Metarbizium flavoviride* apresenta grande potencial para o controle de gafanhotos. Estes insetos se alimentam de gramíneas nativas e de várias culturas economicamente importantes, tais como, arroz, cana-de-açúcar e milho. Uma nuvem de gafanhoto pode conter 40 milhões de indivíduos por quilômetro quadrado, o que representa um consumo diário de 80 mil toneladas de alimentos (Cosenza *et al.* 1994). Esse fato demonstra a importância de se investir esforços para melhor conhecimento da espécie *M. flavoviride*. Estudos realizados em nosso laboratório (Martins, 1998) e também por pesquisadores do Cenargen (Magalhães *et al.* 1997) permitiram concluir que esta espécie apresenta baixa variabilidade genética quando comparada a *M. anisopliae*.

Além de aspectos relacionados com a variabilidade genética, o nosso grupo também tem usado o RAPD para a identificação taxonômica de alguns isolados de fungos entomopatogênicos (Azevedo, 1999) e para o monito-

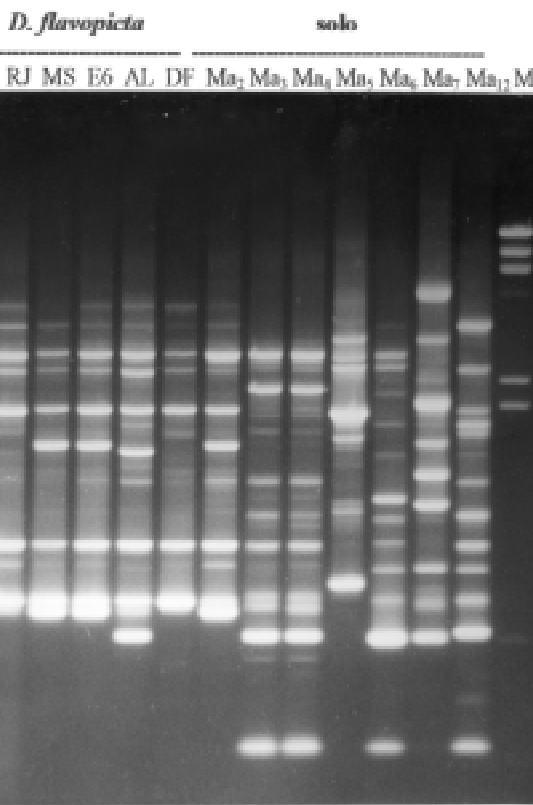


Figura 5. RAPD de 13 isolados de *M. anisopliae* obtido com o primer OPX11. Acima de cada linha encontra-se a denominação do isolado. O isolado E9 foi amplificado duas vezes para se ter um controle de repetibilidade. Na linha M, apresenta-se o marcador de peso molecular (λ DNA *Hind III*). (Fungaro *et al.* 1996)

ramento de cruzamentos entre isolados de *M. flavoviride* (Martins *et al.*, 1999).

Bibliografia

- Azevedo, A. C. S. (1999). Caracterização molecular de *Paecilomyces fumosoroseus* e *P. tenuipes*. Londrina: UEL. 99p. Dissertação, Mestrado.
- Martins, M. K. (1998) RNA de dupla fita em *Metarbizium flavoviride*. Londrina: UEL. 101p. Dissertação de Mestrado.
- Bueno-Gomes R. (2000). Análise genética e molecular da parassexualidade em *Penicillium chrysogenum*. UNESP 140p. Tese, Doutorado.
- Cosenza, G. W.; Ribeiro, J. G. B., de Carvalho, J.S.. (1994). Programa Nacional de controle de gafanhotos. Manual Téc-

nico. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Embrapa-SPI, Brasília, DF 34p.

Fungaro, M. H. P.; Vieira, M. L. C.; Pizzirazni-Kleiner, A. A. & Azevedo, J. L. (1996). Diversity among soil and insect isolates of *Metarbizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. Letters in Applied Microbiology 22: 389-392.

Geisen, R. (1998). PCR Methods for the detection of mycotoxin-producing fungi. In: Bridge P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P. ed. Applications of PCR in Mycology, CAB International, New York, p.243-266.

Magalhães, B P, Faria, M; Tigano, M S, Sobral, B W S (1997). Characterization and virulence of a Brazilian isolate of *Metarbizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes). Memoirs of the Entomological Society of Canadá 171: 313-312.

Martins, M. K.; Furlaneto, M.C.; Sosa-Gomez, D.R.; Faria, M. R. & Fungaro, M. H. P. (1999). Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarbizium flavoviride*. Current Genetics 36: 94-97.

Mullis, K. & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. Methods in Enzymology. 55: 335-350.

Sreenivasaprasad, K., Sharada, K., Brown, A.E, Mills, P.R. (1996). PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology 45: 650-655

Shapira, R.; Paster, N.; Eyal, O.; Menasheerov, M.; Mett, A. & Salomon, R. (1996). Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. Applied and Environmental Microbiology. 62: 3270-3273.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with primers arbitrary. Nucleic Acids Research. 18: 7213-7218.

Williams, J. K. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.