

## **Abordagem morfológica e molecular da diversidade da família Ganodermataceae no estado da Bahia.**

**JEFFERSON LIMA LOPES<sup>1</sup>; Diogo Henrique Costa de Rezende<sup>2</sup>; Raquel Guimarães Benevides<sup>3</sup>;**

1. Bolsista Fapesb, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [jeff.16.jll@gmail.com](mailto:jeff.16.jll@gmail.com)
2. Doutorando, DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [diogo\\_agrolab@hotmail.com](mailto:diogo_agrolab@hotmail.com)
3. Orientador, DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [raquelgb@gmail.com](mailto:raquelgb@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** Basidiomycota, Amplificação, Microrganismos.

### **INTRODUÇÃO**

*Ganodermataceae* Donk (*Polyporales* Gäum, *Agaricomycetes* Doweld) é uma família em que estão contidos fungos macroscópicos do filo Basidiomycota R.T. Moore, que se caracterizam principalmente por apresentar basidiomas pileados, sésseis a estipitados, sistema hifal di-trimítico com presença de hifas esqueléticas arboriformes e pela presença de basidiósporos com parede dupla, onde a interna apresenta ornamentação, sendo esta, uma característica exclusiva do táxon (RYVARDEN, 2004).

Muitas espécies da família causam podridão branca na madeira, sendo que depois de sofrer a ação desses fungos o substrato fica com aspecto esponjoso, fibroso ou laminado e de cor esbranquiçada. Além de saprófitas, a família apresenta espécies que são parasitas obrigatórias e facultativas (FURTADO 1981, TURNER 1981, RYVARDEN 2004, GLEN et al. 2009, KINGE & AM 2011, NAHER et al. 2013).

Tendo em vista que os dados comprovam que somente características morfológicas não são suficientes para delimitação de espécies de *Ganodermataceae*, análises a partir do DNA *Barcode* são uma ferramenta interessante para a abordagem da diversidade da família. O método consiste na utilização de um pequeno segmento padronizado de DNA (código de barras) que seja suficientemente variável a nível específico, mas pouco variável ao nível infraespecífico, baseado na premissa de que a variação genética entre as espécies analisadas excede a variação existente dentro destas mesmas espécies para o segmento de DNA selecionado (HERBERT et al., 2003).

O objetivo deste trabalho, portanto, foi realizar a preparação de espécimes dessa família para estudos moleculares, que servirá de aparato para posterior análise e interpretação da diversidade da família *Ganodermataceae* na Bahia a partir de análises moleculares (DNA *barcoding*).

### **MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)**

Estudos Moleculares

Amostras de DNA previamente extraídas de basidiomas da família Ganodermataceae coletados de diversas localidades no Brasil foram cedidas pelo grupo de pesquisa.

#### Amplificação do DNA (PCR)

Para realizar a PCR foi preciso realizar a diluição do produto de extração de 1 pra 10. Para solução de PCR preparou-se em um tubo de 1,5 ml um mix com reagentes para posteriormente adicionar a amostra de DNA já diluída.

No mix de PCR foram adicionados 13,45 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 2,5 µL de tampão de PCR segundo o fabricante, 0,5 µL de dNTP, 0,75 µL MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio), 1,25 µL dos *Primers* F e R (IDT), e 0,3 µL da Taq Polimerase (KAPPA BIOSYSTEMS). O mix foi preparado em um recipiente com gelo para manter baixa a temperatura dos reagentes até o uso. Foram utilizados os seguintes pares de *primers* para amplificar as regiões LSU, ITS, RPB1 e TEF1, respectivamente: LR0R/LR7 (Binder et al., 2005; Justo & Hibbett, 2011); ITS 6R/ITS8F (Dentinger et al. 2010); RPB1-Af/RPB1-Cr (Matheny & al., 2002; Justo & Hibbett, 2011) e TEF1 EF1-983-F/EF1-2012R (Rehner & Buckley, 2005; Justo & Hibbett, 2011).

Após o preparo do mix adicionou-se a amostra contendo o DNA diluído e em seguida agitado em vortex para depois ser inseridas as amostras em termociclador e neste selecionado o programa para amplificação de acordo com a região que será feita a amplificação (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolo de ciclagem da Amplificação (PCR)

Etapas	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação Inicial	94°–95°C	4–5 min,	1
Desnaturação	94°–95°C	1 min.	35
Anelamento	50° - 57°C	1 min.	35
Extensão	72°C	1 min.	35

Análise da PCR por eletroforese em gel de agarose

Para a eletroforese utilizou-se gel de agarose a 1,2% em 120 mL de tampão TAE. Após 30 minutos a 100 v e 90 mA de corrida eletroforética, o gel foi analisado por visualização em fotografia digital (KODAK EDAS 290<sup>®</sup>). A partir da eletroforese foi possível verificar se houve amplificação do DNA das amostras nas regiões quais foram amplificadas.

#### RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Foram amplificados o material genético para regiões ITS, LSU, RPB e TEF, para os fungos coletados na cidade de Camacan-Ba (Tabela 2), Serra Grande –Ba (Tabela 3), Chapada dos Guimarães- MT (Tabela 4), Novo Airão- AM (Tabela 5) e Belterra- PA (Tabela 6) que apresentaram qualidade na extração de DNA.

No geral, das 42 amostras que foram feitas o procedimento de amplificação para as regiões ITS, LSU, RPB e TEF, apenas 9,52% não amplificaram em nenhuma das regiões.

Para os fungos coletados na cidade de Camacan-Ba (Tabela 2), dos 10 coletados e submetidos à amplificação, apenas 3 não amplificaram nas seguintes regiões: DHCR 502, na região LSU, -DHCR 505 na região ITS, e DHCR 509 nas regiões LSU e RPB.

Tabela 2. Tabela para regiões amplificadas dos fungos coletados em Camacan-Ba

Gênero	Nº de Voucher	ITS	LSU	RPB	TEF
<i>Amauroderma</i>	DHCR496	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR499	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR500	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR501	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR502	X	.*	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR503	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR504	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR505	-	X	X	X
<i>Ganoderma</i>	DHCR509	X	-	-	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR512	X	X	X	X

\*- Amostra não apresentou produto de amplificação

Para os fungos coletados na cidade de Serra Grande-Ba (Tabela 3), dos 03 coletados e feito a amplificação, 2 não amplificaram nas seguintes regiões: DHCR 529, nas regiões LSU,RPB e TEF , DHCR 535 na região TEF.

Tabela 3. Tabela para regiões amplificadas dos fungos coletados em Serra Grande-Ba.

Gênero	Nº de Voucher	ITS	LSU	RPB	TEF
<i>Phellinus</i>	DHCR529	X	.*	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR534	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR535	X	X	X	-

\*- Amostra não apresentou produto de amplificação

Para os fungos coletados na cidade de Chapada dos Guimarães-MT (Tabela 4), dos 26 fungos coletados e feito as análises, 19,23% não amplificaram na região ITS, 30,77% não amplificaram na região LSU, 42,31 % não amplificaram na região RPB, e 65,38% não amplificaram na região TEF.

Tabela 4. Tabela para regiões amplificadas dos fungos coletados na cidade Chapada dos Guimarães-MT.

Gênero	Nº de Voucher	ITS	LSU	RPB	TEF
<i>Amauroderma</i>	DHCR538	X	X	X	.*
<i>Amauroderma</i>	DHCR539	X	-	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR540	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR541	-	-	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR542	X	X	-	-

<i>Amauroderma</i>	DHCR543	-	-	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR544	X	-	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR545	X	X	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR546	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR547	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR548	X	X	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR549	-	-	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR550	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR551	X	X	X	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR552	-	-	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR553	X	X	X	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR554	X	X	X	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR555	X	X	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR556	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR557	-	-	-	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR558	X	-	X	-
<i>Ganoderma</i>	DHCR559	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR560	X	X	X	X
<i>Amauroderma</i>	DHCR561	X	X	X	-
<i>Amauroderma</i>	DHCR562	X	X	-	-

\*- Amostra não apresentou produto de amplificação

Para os fungos coletados na cidade de Novo Airão-AM (Tabela 5), dos 2 coletados e submetidos a amplificação, estes ambos não amplificaram nas seguintes regiões: RPB e TEF.

Tabela 5. Tabela para regiões amplificadas dos fungos coletados em Novo Airão- AM.

Gênero	Nº de Voucher	ITS	LSU	RPB	TEF
<i>Ganoderma</i>	DHCR359	X	X	-*	-
<i>Ganoderma</i>	DHCR379	X	X	-	-

\*- Amostra não apresentou produto de amplificação

Para o fungo coletado na cidade de Belterra- PA (Tabela 6), este não amplificou nas regiões ITS e TEF.

Tabela 6. Tabela para regiões amplificadas dos fungos coletado em Belterra- PA.

Gênero	Nº de Voucher	ITS	LSU	RPB	TEF
<i>Ganoderma</i>	DHCR194	-*	X	X	-

\*- Amostra não apresentou produto de amplificação

Pelo que se pode perceber, o uso da região ITS para amplificação é bastante satisfatório: nos resultados de amplificação mostrados acima, poucos foram os fungos que não amplificaram nessa região. As regiões ITS dispõem de características interessantes para a identificação dos fungos em nível molecular. Uma delas é que, nos fungos, esta região, que compreende entre 600 e 800 pares de bases, é amplificada,

utilizando os *primers* universais, os quais são complementares às sequências altamente conservadas dos genes que codificam o rRNA. Outra característica importante deve-se à natureza repetitiva do rDNA, que torna esta região fácil de amplificar a partir de amostras pequenas, diluídas e altamente degradadas, entretanto, o uso de outras regiões como RPB, LSU e TEF fazem-se necessárias justamente por ser locais mais variáveis (Gardes & Bruns, 1993).

Em relação às regiões RPB, LSU e TEF, para todas houveram amostras que apresentaram produto de amplificação esperado que compreende entre 600 e 800 pares de bases. O uso destas regiões conferem muitas vantagens, pois funcionam com fragmentos pequenos de material biológico, possibilitando a identificação facilitada de espécies associadas à preservação do espécime, que é crítico para preservação de acervos de Museus e Coleções institucionalizadas e também aceleram a identificação de organismos conhecidos e também facilita o reconhecimento rápido de novas espécies (Ali et al., 2014).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

De acordo com a análise das amostras amplificadas houve um grande sucesso no uso da região ITS, pois 83,33 % do total das amostras obtiveram êxito na amplificação, um êxito também a região LSU que obteve-se 73,8% do total das amostras, na região RPB obteve-se êxito na amplificação do total das amostras de 64,28% enquanto que a região TEF obteve-se do total de 47,61%.

Já que houve amplificação em todas as regiões que foram utilizadas, existem então condições para passar às próximas etapas que serão utilizadas para determinação / identificação dos organismos da família.

### REFERÊNCIAS

- ALI, M.A.; GYULAI, G.; HIDVEGI, N.; KERTI, B.; AL-HEMAID, F.M.A.; PANDEY, A.K.; LEE, J. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2014 Jul; 21(3):204-31.
- BINDER, M.; HIBBETT, D. S.; LARSSON, K. H.; LARSSON, E.; LANGER, E. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms in the homobasidiomycetes. *Syst. Biodivers.*, 3: 113–157.
- DENTINGER, B. T. M.; MARGARITescu, S.; MONCALVO, J. M. 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources*, 10: 628–633.
- FURTADO, J.S. 1981. Taxonomy of Amauroderma (Basidiomycetes, Polyporaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 34: 1-109
- Gardes, M.; Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol. Ecol.*, v.2, p.113- 118, 1993.
- Australasian Plant Pathology*, 38: 345–356.
- HERBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*. 270(1512): 313–321,
- JUSTO, A.; HIBBETT, D. S. 2011. Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon*, 60 (6): 1567–1583.
- MATHENY, P. B.; LIU, Y. J.; AMMIRATI, J. F.; HALL, B. D. 2002. Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *Amer. J. Bot.*, 89: 688–698.
- KINGE, T. R.; MIH, A. M. 2011. *Ganoderma ryvardense* sp. nov. associated with basal stem rot (BSR) disease of oil palm in Cameroon. *Mycosphere*, 2(2), 179–188.
- NAHER, L.; YUSUF, U. K.; ISMAIL, A.; TAN, S. G.; MONAL, M. M. A. 2013. Ecological status of *Ganoderma* and basal stem rot disease of oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). *AJCS* 7, 1723-1727.
- REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97: 84–98.
- RYVARDEN L. 2004. Neotropical Polypores: Part 1. Introduction, Ganodermataceae & Hymenochataceae. *Fungiflora*, Oslo.
- TURNER, P. D. 1981. *Oil Palm Diseases and Disorders*. Kuala Lumpur, Oxford University Press, 281 pp.