



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

POSICIONAMENTO FILOGENÉTICO DO COMPLEXO *CIRCINOTRICHUM- GYROTHRIX* (INSERTAE SEDIS, ASCOMYCOTA)

Maria Gabriella Andrade Primo de Souza¹; Luis Fernando Pascholati Gusmão².

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Bacharelado Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mariagabidesouza@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas-DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lgusmao.uefs@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: filogenia, microfungos, genbank.

INTRODUÇÃO

O gênero *Circinotricum* foi descrito por Nees em 1817 com a espécie tipo *C. maculiforme* e é constituído atualmente de 17 espécies (IndexFugorum, 2019). Caracteriza-se por possuir uma seta não-ramificada, castanhas, solitária e estéril, cercada na base por aglomerados de células conidiogênicas, hialinas (Seifert et al., 2011). O gênero *Gyrothrix* descrito por Corda em 1844 com a espécie tipo *G. podosperma* possui atualmente 23 espécies (IndexFugorum, 2019) apresenta setas ramificadas, castanhas, solitária e estéril, cercada na base por aglomerados de células conidiogênicas, hialinas (Seifert et al., 2011). Ambos apresentam ocorrência tropical subtropical e temperada. Para o Brasil foram referidas cinco espécies de *Circinotricum* (*C. britannicum*, *C. falcatisporum*, *C. maculiforme*, *c. olivaceum* e *C. papakurae*) e dez de *Gyrothrix* (*G. circinata*, *G. dichotoma*, *G. grisea*, *G. hughesii*, *G. magica*, *G. microsperma*, *G. podosperma*, *G. ramosa*, *G. verticiclada* e *G. verticillata*) (CRIA, 2019).

Pirozinski (1962) obteve reconhecimento por descrever o grupo *Circinotricum-Gyrothrix* devido à ontogenia dos conídios serem a mesma, ou seja, uma produção aparentemente simultânea de conídios em círculo no ápice das células conidiogênicas e (Kendrick 1982) propôs que se unificassem os dois gêneros com base nos seus caracteres morfológicos. Recentemente, De-Wei et al. (2017) descreveram a mais recente espécie de *Circinotricum*, *C. sinense*, utilizando dados moleculares e incluíram o gênero em Xylariales com um suporte bem robusto, porém a relação filogenéticas continuam indeterminadas entre as espécies. A presente proposta visa incluir os espécimes isolados do Brasil, para verificar se haverá mudanças substanciais na filogenia do complexo.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo morfológico e taxonômico do complexo *Circinotricum-Gyrothrix* foi realizado através espécimes da coleção de cultura do laboratório de micologia da UEFS (CCLAMIC) e na CCMB (Coleção de Cultura de Microrganismos do Estado da Bahia) e de pesquisas bibliográficas de artigos originais da descrição de espécies tipo. Foram montadas tabelas com as medidas de estruturas de importância taxonômica para auxiliar na confirmações das identificações. Para o estudo molecular, dados disponíveis no repositório de dados moleculares (GenBank), foram utilizados para realizar os estudos

filogenéticos, juntamente com sequências já disponíveis no banco de dados de DNA do Laboratório de Micologia (LAMIC) e de 29 acessos (*Gyrothrix* 27; *Circinotrichum* 02) depositados na CCLAMIC e na CCMB (Coleção de Cultura de Microrganismos do Estado da Bahia).

Espécimes em cultura pura do CCLAMIC e CCMB foram reativados em caldo de extrato de malte a 2% para extração do DNA, utilizando-se o protocolo de Doyle & Doyle (1987) adaptado. Foram utilizados marcadores de ITS (White et al. 1990) e LSU (Rehner & Samuels 1994). Os produtos da PCR (Polymerase Chain Reaction) foram quantificados através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%, e em seguida purificados com PEG (Lis & Schleif 1975) e enviados para serem sequenciados na MACROGEN (Coreia do Sul). As sequências obtidas no banco de dados do LAMIC foram editadas no Staden Package (STADEN, 1996) e posteriormente comparadas com as sequências depositadas no GenBank. As matrizes de ITS e LSU foram alinhadas separadamente usando Muscle v.3.8.31 (Edgar, 2004) e concatenados usando SeaView v.4.6.4 (Gouy et al. 2010). Análises de Máxima Verossimilhança (ML) foram efetuadas no RaxML v.8.2.11 (Stamatakis 2014). As árvores foram visualizadas na ferramenta online iTOL (Letunic & Bork 2019) e editadas no editor gráfico vetoriais Inkscape v.0.92.4 (www.inkscape.org).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 29 culturas presentes na CCLAMIC e CCMB foram reativados 16 (*Gyrothrix* 14; *Circinotrichum* 02), devido a problemas de contaminação nas culturas, apenas 9 (*Gyrothrix* 08; *Circinotrichum* 01) cresceram puras e destas foram realizadas as extrações de DNA. Para o marcador ITS, foi obtido sucesso em todas as amostras, no entanto para o marcador LSU não se obteve êxito em nenhuma das ampliações, provavelmente devido a problemas no processo de purificação.

As análises filogenéticas com base nos marcadores de ITS e LSU (Figura 3) corroboram com Li *et al.* (2017) onde os gêneros *Gyrothrix*, *Circinotricum* e *Idriella* P.E. Nelson & S. Wilh. são considerados polifiléticos. Dois clados da filogenia ora obtida corroboram com a filogenia de Li *et al.* (2017), onde o primeiro clado foi composto por *C. maculiforme* Nees, *C. sinense* D.W. Li, Neil P. Schultes, et al. e *G. circinata* (Berk. & M.A. Curtis) S. Hughes; o segundo clado ficou representado por *I. lunata*, *G. ramosa* Zucconi & Onofri, *G. inops* (Berl.) Piroz., *C. cycadis* Crous & R.G. Shivas e *C. papakurae* S. Hughes & Piroz. Na análise filogenética *Circinotrichum* sp. (LAMIC001304, LAMIC0402-37) ficaram em um clado monofilético, sendo possivelmente uma nova espécie, no entanto a análise da morfologia será de fundamental importância para essa afirmação, visto que apenas quatro espécies de *Circinotrichum* tem seu DNA sequenciado. Na presente filogenia, quatro espécies de *Gyrothrix* formaram grupos monofiléticos com *Idriella* sp.: *G. dichotoma* Piroz. (BE74), *G. verticiclada* (Goid.) S. Hughes & Piroz. (MUCL54554, MUCL54063), *G. ramosa* Zucconi & Onofri e *G. inops* (Berl.) Piroz., refletindo mais uma vez a condição polifilética de *Idriella* sp.

Pirozynski (1962) havia considerado a relação dos gêneros *Gyrothrix* e *Circinotrichum* com base nas semelhanças dos seus caracteres morfológicos, diferenciando-os apenas pela seta ramificada em *Gyrothrix* e não ramificada em *Circinotrichum*. Com base em dados filogenéticos, já demonstrados por Li *et al.* (2017), a presente análise também constata que os caracteres morfológicos dos gêneros não são suficientes para separar os gêneros *Gyrothrix* e *Circinotrichum* visto que ambos aparecem juntos com suporte em ambas as filogenias. Das sequências obtidas do banco de dados moleculares do LAMIC, a sequência de *Gyrothrix* LAMIC003211-2 foi identificada como sendo da espécie *G. pediculata* visto que ambas formaram um clado

monofilético. Para as sequências de *Circinotrichum* sp. (LAMIC001304 e LAMIC0402-37) é sugerido que provavelmente seja uma espécie nova, sendo necessário de uma reativação dos isolados a fim de descrevê-los formalmente.

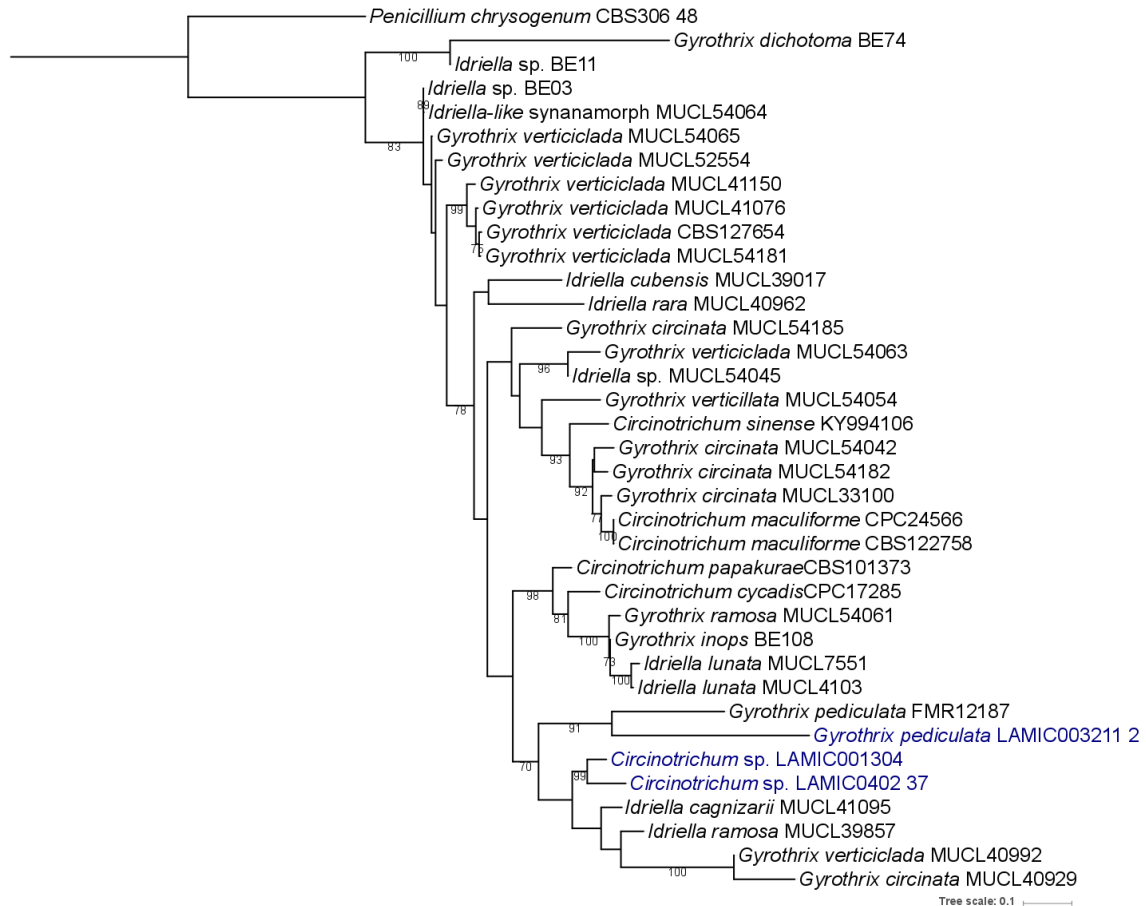


Figura.1. Análise de máxima verossimilhança dos gêneros *Gyrothrix* e *Circinotrichum* com taxa alinhada baseada em ITS e LSU concatenados. *Penicillium chrysogenum* é adicionado como grupo externo. Valores de Bootstrap e Bayesianas > 70% destacados em negrito. Sequências disponíveis no banco de dados do LAMIC destacadas de azul.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, corroborando com as análises filogenéticas presentes até o momento, e com os resultados obtidos é possível que futuramente, com a inclusão de mais isolados e mais marcadores, se concretize uma unificação dos gêneros *Circinotrichum* e *Gyrothrix*, visto que a ramificação da seta não é um caráter suficiente para separa-los como o presente trabalho aponta, mesmo com poucas sequencias analisadas. Os gêneros se agrupam em clados com considerável suporte, podendo ser interpretado uma como evidência molecular.

REFERÊNCIAS

CRIA (CENTRO DE REFERÊNCIA E INFORMAÇÃO AMBIENTAL). 2019. SpeciesLink simple search. Disponível em <http://www.splink.org.br> (acesso em 27/07/2019)

- DE-WEI, LI, SCHULTES, N.O., CHEN, J.Y. & CASTAÑEDA-RUIZ, R.F. 2017. *Circinotrichum sinense*, a new fungus from Hubei, China. *Botany* 95: 1099-1108.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19 (1): 11-15.
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5): 1792-1797.
- GENBANK. 2019. GenBank. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> em 27/02/2019).
- GOUY M., GUINDON S., GASCUEL O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27: 221–224.
- HUGHES, S.J. & PIROZYNSKI, K.A. 1971. New Zealand Fungi 15. *Beltraniella*, *Circinotrichum* and *Gyrothrix* (syn. *Peglionia*). *N. Z. J. Bot.* 9: 39-45.
- LETUNIC, I. and BORK, P. 2019. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- LIS, J.T.; SCHLEIF, R. 1975. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research* 2 (3): 383-389.
- PIROZYNSKI, K.A. 1962. *Circinotrichum* and *Gyrothrix*. *Mycol. Pap.* 84: 1-128.
- REHNER, S.A. & SAMUELS, G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98: 625-634.
- STADEN, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5: 233–241.
- STAMATAKIS, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9):1312-1313.
- WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (eds Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J.), p. 315–322. Academic Press, San Diego, California.