



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76

PPPG credenciamento 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**

**EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE FUNGOS
SELECIONADOS DA COLEÇÃO DE CULTURA DE MICRORGANISMOS DO
ESTADO DA BAHIA (CCMB)**

Maurício L. G. Costa¹; Luís F. P. Gusmão²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mauricio-lucas@live.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lgusmao.uefs@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: DNA; Fungos tropicais.

INTRODUÇÃO

Os fungos são de grande importância para a sociedade não só ecologicamente, mas também economicamente, na medicina, evolutivamente, na gastronomia, e até mesmo na arte (Alexopoulos, 1996). De acordo com Shenoy & Hyde (2007), os fungos representam o maior clado dentro da árvore da vida (tree of life). Seguindo este pensamento, uma filogenia nada mais que é uma hipótese de genealogia de um grupo de organismos e seus ancestrais hipotéticos, isso pode ser representado diagramaticamente através de uma árvore filogenética. Nos últimos anos a biologia molecular tem modificado consideravelmente a sistemática no Reino Fungi, sendo propostas novas taxa em todos os extratos hierárquicos (famílias, ordens, classes, filos, etc...). No entanto, apesar dessas mudanças, existem muitas espécies sem seu DNA conhecido, principalmente nas regiões tropicais (Shenoy & Hyde 2007). A CCMB é um repositório de fungos em cultura pura e para uma identificação/autenticação correta a utilização de técnicas moleculares são de suma importância. Os processos de extração, PCR e sequenciamento com primers específicos para fungos, são extremamente importantes na utilização de técnicas moleculares, pois a partir desses processos podemos realizar estudos

filogenéticos descobrindo possíveis novos taxóns, contribuindo assim para a descoberta de mais uma peça do quebra-cabeça da história dos seres vivos no planeta Terra.

MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos para este trabalho foram cedidos pela Coleção de Microrganismos do Estado da Bahia (CCMB).

Foram utilizados noventa e seis fungos para a extração do DNA total da massa micelial crescida em caldo de cultura extrato de malte. O DNA total dos isolados fúngicos em cultura foi extraído utilizando o Dneasy® Plant Mini Kit da qiagen de acordo com a especificação do fabricante.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi a técnica empregada para amplificar os fragmentos-alvo, utilizando o termociclador Applied Biosystems Geneamp 9700. Para a amplificação do espaçador interno transcrito (ITS) foram utilizados os iniciadores (ITS 4 e ITS1-F). 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).

Uma placa com noventa e seis amostras dos produtos da PCR purificados foi encaminhada para a Macrogen Inc.(Corea do Sul) para o processo de sequenciamento.

RESULTADOS

Das noventa e seis amostras de fungos, apenas uma o sequenciamento não foi obtido sucesso (*Dendrosporium* sp.) (Tabela 1). As demais foram sequenciadas com sucesso.

Thozetella ssp. foi o gênero mais trabalhado (trinta e três amostras) pois é comum nos trópicos e estudos relacionados a sua filogenia estão em andamento no LAMIC. Os fungos não identificados (NI) foram outro alvo estratégico com quatorze amostras, pois os mesmos não foram identificados de forma morfológicamente, ou seja, não se chegou a uma identificação a contento e podem representar novas espécies para a ciência, após estudos filogenéticos. O gênero *Gyrothrix* ssp. foi o terceiro mais amostrado em virtude de trabalhos filogenéticos desenvolvidos também no LAMIC. Dentre os demais fungos, *Isthmolongispora* sp., *Pseudaegerita* sp. e *Triscelophorus* sp. são representantes de fungos aquáticos, e com

poucos isolados em cultura pura no mundo, bem como, *Lappodochium* sp. sendo este último o segundo registro para o mundo e o único em cultura pura, desta forma, o posicionamento filogenético destes espécimes será inédito para a ciência.

Tabela 1. Lista de espécimes com DNA extraído, amplificado (PCR) e sequenciado. (NI – não identificado)

Táxon	Número de isolados	Extração	PCR	Sequenciamento
<i>Brachysporiella</i> sp.	1	X	X	X
<i>Cryptocoryneum</i> sp.	1	X	X	X
<i>Dendrosporium</i> sp.	2	X	X	
<i>Desertella</i> sp.	1	X	X	X
<i>Dictyoarthrinium</i> sp.	1	X	X	X
<i>Dictyosporium</i> sp.	2	X	X	X
<i>Ellisemia</i> sp.	1	X	X	X
<i>Ellisemiopsis</i> sp.	1	X	X	X
<i>Fusichalara</i> sp.	1	X	X	X
<i>Fusticeps</i> sp.	1	X	X	X
<i>Gyothrix</i> sp.	8	X	X	X
<i>Isthmolongispora</i> sp.	1	X	X	X
<i>Lappodochium</i> sp.	1	X	X	X
<i>Mariannaea</i> sp.	1	X	X	X
<i>Myrmecridium</i> sp.	2	X	X	X
<i>Obelispora</i> sp.	1	X	X	X
<i>Ostropella</i> sp.	1	X	X	X
<i>Periconia</i> sp.	2	X	X	X
<i>Phaeocandelabrum</i> sp.	2	X	X	X
<i>Pseudaegerita</i> sp.	3	X	X	X
<i>Selenosporella</i> sp.	1	X	X	X
NI	14	X	X	X
<i>Sporendocladia</i> sp.	1	X	X	X
<i>Sporidesmium</i> sp.	3	X	X	X
<i>Thozetella</i> sp.	33	X	X	X
<i>Triscelophorus</i> sp.	4	X	X	X
<i>Vanakripa</i> sp.	1	X	X	X
<i>Verticicladius</i> sp.	2	X	X	X
<i>Volutella</i> sp.	1	X	X	X
<i>Wiesneromyces</i> sp.	2	X	X	X
Total	96	96	96	95

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral visou extrair, amplificar e sequenciar os isolados de grupos seletos de fungos foi alcançado, obtendo como resultado a extração do DNA de noventa e seis isolados e destes noventa e cinco com sucesso no sequenciamento.

A identificação molecular tem um grande papel de acelerar a bioprospecção e outras áreas de investigação, corroborando a identificação morfológica e contribuindo para a acurácia da taxonomia. Portanto, é importante o aumento de sequências identificadas corretamente que alimentam os bancos de nucleotídeos e futuros estudos para desvendar a filogenia do grupo em questão.

REFERÊNCIAS

- Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 – 8.
- A. Stamatakis: "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". In Bioinformatics, 2014. Staden, R. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5, 233-241 (1996)
- Nasidze I, M. Stoneking. 1999. Short Technical Reports: Construction of larger-size sequencing templates from degraded DNA. *Biotechniques* 27 (September): 480-88
- OSWALD, Nick. . In: OSWALD , Nick; KENNEDY, Suzanne; HOGAN, Megan; CARTWRIGHT, Megan. 10 Things Every Molecular Biologist Should Know. United Kingdom, © 2012. Disponível em: <https://bitesizebio.com/10-things-every-molecular-biologist-know/>. Acesso em: 1 jul. 2019.
- ALEXOPOULOS, C. J., MINS, C. W. & BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*(4° ed.).
- Shenoy, B.D., Jeewon, R. and Hyde, K.D. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 26: 1-54.
- Lis JT, Schleif R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucl Acids Res* 1975; 2:383-90