

Barcoding de microrganismos da Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia

Myrna F. B. Antunes¹, Luís F. P. Gusmão²

1. Bolsista PIBIC/CNPQ, Graduando em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: myrna.antunes@hotmail.com.
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lgusmao@uefs.br.

Palavras chave:
Fungos conidiais; ITS.

INTRODUÇÃO

Os Fungos Conidiais pertencem a um grupo polifilético e heterogêneo, não sendo considerados como categoria taxonômica, pois agrupam os fungos que representam as fases assexuais associadas aos Filos Ascomycota e Basidiomycota, (GUSMÃO, L. F. P. *et al.*, 2006). Uma classificação baseada em caracteres ontogênicos e morfológicos tradicional aos outros grupos fúngicos, não se aplica a estes fungos, pois os mesmos não apresentam níveis hierárquicos mais elevados como ordem e família (Mercado Sierra, 1984). A análise de similaridade e divergência entre fragmentos alvos, a existência de espécies críptas são grandes desafios aos micologistas. O estudo do DNA de fungos torna-se essencial de acordo com esse panorama.

Os segmentos do DNA nuclear ribossomal são frequentemente utilizados em estudos de filogenia em diversos níveis taxonômicos, possuindo as sequências que sintetizam para a subunidade ribossomal menor (SSU) e para a subunidade ribossomal maior (LSU), separadas pelo espaçador interno transcrito (ITS), um segmento não-codificante (WHITE *et al.*, 1990). Enquanto isso, os genes que sintetizam para β -tubulina, proteína importante para a formação dos microtúbulos, que por sua vez, são essenciais para transporte intracelular e divisão celular (Einax E. *et al.*, 2003), estão recebendo cada vez mais atenção na investigação de relações evolutivas em todos os níveis em estudos de grupos de espécies complexas dentro protistas, animais, fungos e plantas (Mages *et al.* 1995, de Keeling *et al.* 1998, Schutze *et al.* 1999, Ayliffe *et al.* 2001, Edgcomb *et al.* 2001) pela sua viabilidade em identificação específica, além de sua taxa de sucesso na amplificação por PCR e sequenciamento (Zhao P. *et al.*, 2010).

O presente estudo visa identificação molecular de isolados de fungos cadastrados na coleção de cultura do Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, sendo esta a única coleção de cultura de microrganismos exclusivamente do Semiárido, estando atrelada à Coleção de Cultura de Microrganismos do Estado da Bahia (CCMB).

MATERIAL E MÉTODO

O DNA foi extraído da massa micelial crescida em caldo de cultura extrato de malte. A massa micelial foi macerada em nitrogênio líquido com um pistilo diretamente no tubo Eppendorf 1,5 ml. A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1987). A ressuspensão foi feita com tampão T.E. previamente autoclavado. A análise qualitativa e quantitativa do material extraído foi realizada por meio de eletroforese com aplicação de 3 μ L no gel de agarose e a visualização dos fragmentos de DNA foi visualizada através de transiluminador de luz

ultravioleta. Após a corrida, os géis foram fotografados com o sistema de fotografia digital Kodak Edas 290.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi a técnica empregada para amplificar os fragmentos-alvo, utilizando o termociclador Applied Biosystems Geneamp 9700. Os produtos de PCR foram purificados com solução polietileno glicol (PEG), de acordo com o protocolo de Paithankar & Prasad (1991). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados diretamente.

As sequências foram então editadas no Staden Package. Posteriormente, as sequências-consenso foram inseridas no Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), comparando-as com as sequências do banco de nucleotídeos do NCBI e obtendo a identificação por máxima semelhança.

RESULTADO

Culturas puras dos 15 espécimes foram utilizados para extração e amplificação: Celomiceto, Colletotrichum sp., Obilospora sp., Speiropsis scopiformis, Thozetella, T. bojiensis, T. buxifolia, T. cubensis, T. pinicola, T. radicata, T. submersa, Umbellidium radulans, Vermiculariopsiella sp. Zygosporium echinosporium e Z. egibbu. Um total de 40 isolados passaram pelo processo de extração de DNA e amplificação com o marcador ITS. Como tentativa de sucesso para este marcador, foi necessária a alteração de temperaturas e número de ciclos para amplificação das regiões correspondentes. No decorrer do trabalho, tivemos problemas com o sequenciador, bem como, com protocolos de amplificação utilizado para os diferentes espécimes, atrasando assim, os resultados e gerando complicações para com o cronograma proposto. Desta forma, das 40 extrações, apenas 6 foram sequenciadas. As 8 amostras sequenciadas foram editadas através do Staden Package (Staden, 1996) e as sequências foram comparadas com as depositadas no NCBI e BOLD. Destes Celomiceto, T. bojiensis, T. buxifolia, T. cubensis, T. pinicola, T. radicata e T. submersa, obtiveram 98% de acurácia nas comparações às amostras depositadas no NCBI e BOLD.

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o protocolo utilizado é adequado para a extração de DNA em fungos conidiais.

Em relação aos resultados obtidos da PCR, comprovou-se a pertinência do marcador ITS como *DNAbarcode* padrão em fungos.

As sequências obtidas estarão disponíveis para estudos dos quais são exigidas bases moleculares. Pesquisadores cujos trabalhos abordam inferências filogenéticas poderão dispor dessas sequências; espécies inéditas ou novos registros; terão os *DNAbarcodes* como dados complementares à publicação, corriqueiramente exigidos nas principais revistas científicas, tais como Mycotaxon, Mycologia, Fungal Diversity, Studies in Mycology e Micological Progress. Também ficarão disponíveis para consulta taxonômica assim como as sequências depositadas no BOLD e no NCBI. As amostras de DNA total foram depositadas no Banco de DNA do Laboratório de Sistemática Molecular Vegetal, ficando acessíveis para pesquisas afins.

Tabela 1. Relação dos gêneros extraídos, amplificados para ITS e sequenciados.

<i>ESPÉCIMES</i>	Nº ISOL	EXT	PCR	SEQ	%
<i>Celomiceto</i>	3	X	X	X	98
<i>Colletotrichum</i>	3	X	X		
<i>Obilospora</i>	3	X	X		
<i>Speiropsis scopiformis</i>	3	X	X		
<i>Thozetella</i>	3	X	X	X	98
<i>T. bojiensis</i>	3	X	X	X	98
<i>T. buxifolia</i>	3	X	X	X	98
<i>T. cubensis</i>	3	X	X	X	98
<i>T. pinicola</i>	3	X	X	X	98
<i>T. radicata</i>	3	X	X	X	98
<i>Thozetella submersa</i>	3	X	X	X	98
<i>Umbellidium radulans</i>	3	X	X		
<i>Vermiculariopsiella sp.</i>	3	X	X		
<i>Zygosporium echinosporium</i>	3	X	X		
<i>Zygosporium egibbum</i>	3	X	X		
TOTAL	45	45	45	8	98

CONCLUSÃO

O objetivo geral que visou extrair, amplificar e sequenciar os isolados de fungos foi alcançado, obtendo como resultado a extração do DNA de quarenta isolados e seis deles sequenciados. 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 sequencias identificadas corretamente que alimentam os bancos de nucleotídeos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALEXOPOULOS, C. J., MINS, C. W. & BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology* (4^o ed.).
- BEGEROW, D., NILSSON, H., UNTERSEHER, M., MAIER, W., 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl. Microbiol. Biot.* 87, 99-108.
- BRUNS, T.D.; WHITE T.J.; TAYLOR, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22, 525–564.
- CHASE, M.W.; FAY, M.F. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Science* 325, 682-683. Dissertação Cumulativa para o Grau de Doutorado em Ciências Naturais na Faculdade de Biologia da Munich Ludwig-Maximilians-University.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- EBERHARDT, U. 2010. A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi. *New Phytol.* 187, 265–268.
- GILMORE, R.S.; GRAFENHAN, T.; LOUIS-SEIZE, G.; SEIFERT, K.A.; 2009. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 90–98.
- GUSMÃO, L.F.P & MAIA, L.C, 2006. Diversidade e Caracterização dos Fungos do Semi-árido Brasileiro. *Associação de Plantas do Nordeste*, vol. II, Ministério da Ciência e Tecnologia. 219 pp.
- HAWKSWORTH, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105, 1422–1432.
- HILLS, D.M.; DIXON, M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Ver. Biol.* 66, 411-452.
- LANE, N. 2009. On the origin of bar codes. *Nature* 462, 272-274.
- MAIA, L.C, YANO-MELO, A.M. & CAVALCANTI, M.A. 2006 Diversidade de fungos no estado de Pernambuco. In: M. Tabarelli & J.M.C. Silva, *Diagnóstico de Biodiversidade de Pernambuco*. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, Ed. Massangana, Recife, pp. 15-50. ROSSMAN, A. 2007. Report of the Planning Workshop for All Fungi DNA Barcoding. *Inoculum* 58(6): 1- 6.
- SEIFERT, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol. Resour.* 9 (Suppl. 1), 83–89.
- SEIFERT, K.A.; SAMSON, R.A.; deWAARD, J.R.; HOUBRAKEN, J.; LÉVESQUE, C.A.; MONCALVO, J-M.; LOUIS-SEIZE, G.; HEBERT, P.D.N. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3901–3906.
- STADEN, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Mol. Biotechnol.* 5:233–241.
- STOCKINGER, H. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi.
- STOECKLE, M.Y.; HEBERT, P.D.N. 2008. Barcode of life: DNA tags help classify life. *Sci. Am.* 299, 82–88.
- 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.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego, California.