

Barcoding de microfungos do Semi-árido

Tiago Andrade Borges Santos¹; Luís Fernando Pascholati Gusmão² e Alisson Cardoso Rodrigues da Cruz³

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tabsantos@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lgusmao@uefs.br
3. Co-Orientador, Bolsista de Doutorado CAPES, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: acrucru.uefs@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Barcode of life*, ITS, CO1.

INTRODUÇÃO

Os fungos são reconhecidos como grupo monofilético, caracterizados por uma nutrição heterotrófica absorptiva, com estrutura somática geralmente filamentosa, denominadas hifas, que produzem esporos de origem sexual ou assexual (Seifert, 2009). Estimativas citam a existência de até 15 milhões de espécies, sendo considerado entre 1-1,5 milhão (Hawksworth, 2001).

O *Barcode of life* figura como uma iniciativa que tem como objetivo o armazenamento de sequências de DNA da biodiversidade. Esse empreendimento foi desenvolvido visando a catalogação de novas espécies a custos reduzidos, permitindo a qualquer pessoa identificar espécimes de forma rápida, democratizando a informação acerca da biodiversidade no planeta (Stoeckle & Hebert, 2008). Antes do termo “*barcode*” ter assumido esse significado, bancos de dados de sequências de DNA estavam sendo desenvolvidos para facilitar a identificação de fungos (Bruns *et al.*, 1991). Após o desenvolvimento de *primers* universais por White *et al.* (1990), o espaçador interno transcrito (ITS) tornou-se o marcador padrão para estudos ao nível de espécie à maioria dos fungos. Trata-se de uma sequência com um alto número de cópias presente no DNA nuclear, localizada entre os seguimentos que codificam para a subunidade ribossomal maior (LSU) e a subunidade ribossomal menor (SSU) (Chase & Fay, 2009; Hills & Dixon, 1991). A região ITS nos fungos é rica em inserções e deleções, tornando-o útil para o desenvolvimento de *primers* táxon-específicos (Stockinger, 2010).

A proposta do *Consortium for Barcode of Life* (CBOL) era estabelecer o CO1, segmento do DNA mitocondrial que sintetiza para a subunidade I da citocromo *c* oxidase, como *DNAbarcode* universal (Lane, 2009), uma vez que já era utilizado para inferência filogenética em insetos, apresentando boa resolução intra e interespecífica (Begerow *et al.*, 2010). No entanto, dificuldades foram encontradas no sequenciamento desse seguimento em plantas e fungos (Chase & Fay 2009), visto que essa região apresenta muitos íntrons (Eberhardt, 2010), reduzindo consideravelmente a acurácia da identificação de espécies nesses dois grupos. No entanto, estudos estão em curso para testar a viabilidade do CO1 como *DNAbarcode* em fungos (Seifert *et al.*, 2007; Seifert, 2009; Gilmore *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo gerar *DNAbarcodes* de isolados de fungos cadastrados na coleção de cultura do Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, a qual figura como a única coleção de cultura de microfungos exclusivamente do Semi-árido, estando atrelada à Coleção de Cultura de Microrganismos do Estado da Bahia (CCMB).

MATERIAL E MÉTODOS

O DNA foi extraído de isolados cultivados em extrato de Malte, os quais foram pulverizados com nitrogênio líquido e submetidos ao protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987); a ressuspensão foi efetuada com tampão Tris-Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (TE), seguindo-se da análise por eletroforese. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi a técnica empregada para amplificar os fragmentos alvos; para a região ITS foram usados os iniciadores ITS5 e ITS4, enquanto que AHyFu-F e AHyFu-R foram os iniciadores da região CO1. Os amplicons foram purificados e sequenciados. As sequências foram editadas no Staden Package (Staden, 1996) e alinhadas com amostras do banco de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information (NCBI), assim como no Barcode of Life Data Systems (BOLD).

As amostras de DNA total foram depositadas no Banco de DNA do Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas da Universidade Estadual de Feira de Santana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 27 isolados teve seu DNA sequenciado para ITS. A amplificação da região CO1 não correspondeu às expectativas. Apenas um isolado teve seu *DNAbarcode* gerado para CO1 (Tabela 1).

Em relação à reação em cadeia da polimerase, dois padrões foram observados. Referindo-se à PCR com *primers* ITS4/ITS5 (White *et al.*, 1990), os produtos obtidos mostraram-se satisfatórios, comprovando a pertinência do marcador ITS como *DNAbarcode* padrão em fungos. No entanto, para a região CO1 não foi estabelecido um protocolo de PCR que favorecesse a amplificação do DNA total de todos os isolados. Foram realizados testes com os iniciadores CO1 (AHyFu-F e AHyFu-R) de acordo com o protocolo descrito por Gilmore *et al.* (2009) em espécimes de cinco gêneros diferentes, sem sucesso. Modificações no protocolo original foram efetuadas, mas a quantificação por eletroforese indicou ausência de DNA em quase totalidade dos produtos de PCR referidos ao seguimento CO1. Rossman (2007) reconhece que diferentes *primers* do seguimento CO1 são necessários para diferentes gêneros de fungos. Portanto, testes utilizando outros iniciadores CO1 tornam-se oportunos.

Tabela 1. *DNAbarcodes* gerados para ITS.

Cód. LAMIC	Cód. LAMOL	Isolado
0042/06	20038	<i>Beltrania rhombica</i> Penz.
0007/07	10630	<i>Periconia byssoides</i> Pers.
0013/07	10632	<i>Memnoniella echinata</i> (Rivolta) Galloway
0041/07	10633	<i>Phialomyces</i> sp.*
0067/06	10634	<i>Beltraniella</i> sp.
0006/09	10635	<i>Beltrania rhombica</i> Penz.
0049/08	10637	<i>Beltraniella portoricensis</i> (F. Stevens) Piroz. & S.D. Patil
0069/07	10639	<i>Beltrania rhombica</i> Penz.
0027/06	10640	<i>Aspergillus</i> sp.
0012/08	10641	<i>Stachybotrys nephrospora</i> Hansf.
0025/10	10643	<i>Verticillium</i> sp.
0018/08	10644	<i>Chloridium</i> sp.
0031/08	10646	<i>Verticillium</i> sp.
0093/08	10648	<i>Spegazzinia</i> sp.
0033/08	10649	<i>Memnoniella levispora</i> Subram.

Cód. LAMIC	Cód. LAMOL	Isolado
0023/08	10650	<i>Vermiculariopsiella</i> sp.
0075/08	10655	<i>Curvularia intermedia</i> Boedijn
0101/08	10657	<i>Chloridium</i> sp.
0108/08	10664	<i>Phaeostalagmus tenuissimus</i> (Corda) W. Gams & Hol.-Jech.
0082/08	10665	<i>Memnoniella</i> sp.
0028/10	10732	<i>Speiropsis</i> sp.
0044/08	10670	<i>Pithomyces</i> sp.
0116/08	10751	<i>Stachybotrys</i> sp.
0123/08	10672	<i>Cryptophialoidea</i> sp.
0107/08	20039	<i>Chloridium</i> sp.
0109/08	20040	<i>Pyricularia rabaulensis</i> Matsush.
0106/08	10674	<i>Verticillium</i> sp.

*Também sequenciado para COI.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta de amplificar para a região ITS foi cumprida e os *DNAbarcodes* foram gerados, contribuindo tanto para a identificação molecular dos espécimes, quanto para alimentar o banco de nucleotídeos. O presente trabalho trata-se de uma iniciativa pioneira para a identificação de fungos do Semi-árido brasileiro, cujos resultados darão suporte para futuros inventários da micobiota da região.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4. ed. John Wiley & Sons, New York.
- 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.
- 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.
- 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.

ROSSMAN, A. 2007. Report of the Planning Workshop for All Fungi DNA Barcoding. *Inoculum* 58(6): 1- 6.

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.

SEIFERT, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol. Resour.* 9 (Suppl. 1), 83–89.

STADEN, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Mol. Biotechnol.* 5:233–241.

STOECKLE, M.Y.; HEBERT, P.D.N. 2008. Barcode of life: DNA tags help classify life. *Sci. Am.* 299, 82–88.

STOCKINGER, H. 2010. *DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi*. Dissertação Cumulativa para o Grau de Doutorado em Ciências Naturais na Faculdade de Biologia da Munich Ludwig-Maximilians-University.

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.