

IDENTIDADE DE FUNGOS ISOLADOS DE MADEIRA SUBMERSA EM DECOMPOSIÇÃO DE UM LAGO NO MUNICÍPIO DE IRANDUBA-AM

Tatiana Freitas FIGUEIREDO¹
João Vicente Braga de SOUZA²
Ana Claudia Alves CORTEZ³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;
²Orientador Laboratório de Micologia / INPA;
³Colaboradora Laboratório de Micologia / INPA.

INTRODUÇÃO

No ecossistema aquático, os fungos exercem vários papéis como o de composição de materiais orgânicos, parasitária, predadora e mutualista (Shearer *et al.* 2007). No bioma Amazônico, atuam na decomposição do material orgânico que se deposita no fundo dos rios promovendo a clivagem dessas matérias suprindo toda uma cadeia alimentar a partir dos substratos gerados por essa ação. Além disso, auxiliam na limpeza das águas dos rios e lagos (Pusch *et al.* 1998). Embora representem grande importância, são escassos estudos científicos que relatem a biodiversidade desses microrganismos presente no ecossistema de água doce Amazônico (Galliza 2011). Isso demonstra a pobreza de informações a respeito dos microrganismos existentes no ecossistema aquático amazônico. Essa ausência de informações acarreta em atraso científico, perda de material biológico em função da biopirataria, perda do desenvolvimento de possíveis novos compostos para o combate de doenças, além do desconhecimento do real valor e papel dos fungos nesse habitat (Drummond 2009).

Trabalhos com esse desenho de investigação são importantes uma vez que a sociedade tem invadido e destruído o meio ambiente ocasionando na maioria das vezes perda de diversidade. Dessa forma, a necessidade de se conhecer as espécies de fungos que habitam as águas doces da Amazônia aponta para um potencial de descoberta científica ainda não explorada.

Observando-se a necessidade de preencher essa lacuna, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação de fungos de água doce provenientes de um lago do Município de Iranduba, que se encontravam preservados sob refrigeração de geladeira a mais de um ano, através do Sequenciamento das Regiões *Its* do rDNA desses microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das amostras: Através de expedições realizadas em períodos de cheia e seca em um lago de águas negras pertencente ao Município de Iranduba, foram coletados pedaços de pau e pequenos gravetos depositados no fundo dessas águas. Após, as estruturas fúngicas encontradas na madeira foram isoladas para cultivo em placas de petri contendo meio ágar-água, e conservadas em geladeira por mais de um ano. Para o presente estudo, os exemplares foram semeados em triplicata, em tubos de ensaio contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e incubados a temperatura ambiente, aguardando-se sua maturação por aproximadamente quatro meses. Em seguida, as amostras que obtiveram viabilidade, foram submetidas ao processo de extração de DNA através da metodologia descrita por Ferrer *et al.* (2009) que consistiu em: Os micélios foram transferidos para microtubos de 2 mL. A seguir, adicionou-se ao recipiente 500 µL de tampão de lise (contendo SDS a 0,5%, NaCl a 1,4%, EDTA a 0,73% e 20 mL de Tris-HCl para 100 mL de água destilada)

e 5 µL de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram submetidos a aquecimento de 65 °C por 1 hora, com a finalidade de romper as estruturas celulares. Foi adicionado 500 µL de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (v:v:v 25:24:1). O material foi agitado em vórtex até a obtenção de uma suspensão homogênea. Em seguida, essa suspensão foi centrifugada (14.000 rpm, 15 minutos) e o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se Isopropanol ao sobrenadante em volume igual, a mistura foi homogenizada e incubada a -20 °C overnight, para precipitação do DNA. O DNA precipitado foi centrifugado (14.000 rpm por 15 minutos), lavado duas vezes seguidas com etanol 70% e ressuspensionado em 100 µL de água-bidestilada estéril.

Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de Reação de PCR, de acordo com o protocolo descrito por White *et al.* (1990), e as concentrações dos reagentes se observa no Quadro 1 a seguir:

Quadro 1. Mix da PCR.

Reagentes	Tampão	MgCl ₂	dNTPs	Primers <i>Its1</i> / <i>Its4</i>	Taq polimerase	Dna Template	H ₂ O
Concentração	10x	1,5 mM	200 µM	1µM	1,5 U	90 ng	QSP

Após uma desnaturação inicial de 94 °C por 3 min, seguiram-se 35 ciclos que consistiram de desnaturação do DNA a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 49,5 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, e mais 10 ciclos de desnaturação do DNA a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 53,5 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Finalmente foi realizada uma extensão final a 72 °C por 7 min. As amostras foram resfriadas a uma temperatura de 4 °C até o momento de serem retiradas do termociclador. Os produtos de DNA foram novamente submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio a 0,5µg/ml e visualizados em transiluminador e fotografados. Por fim, as reações amplificadas foram purificadas seguindo a descrição de Dunn e Blanter (1987):

Purificação do DNA amplificado: Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se uma solução de polietilenoglicol-PEG (10g de polietilenoglicol 800, 7,3 g de NaCl em 35 mL de água). Volumes iguais das soluções de PEG e de amplicons foram transferidos para microtubo (1,5 mL), homogenizados e incubados (37 °C por 15 minutos). Em seguida, a mistura foi centrifugada (15 minutos a 6.000 g), o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol a 70% seco em estufa de secagem até a evaporação completa de todo o etanol. Em seguida, os produtos foram ressuspensos em água-bidestilada estéril em volume igual ao da PCR e receberam agitação de 10 segundos. Foram armazenados a temperatura de - 20°C overnight para melhor eluição do DNA.

Edição e alinhamento das sequências: Os fragmentos de DNA foram sequenciados nas direções senso e antissenso no Laboratório de Genômica do Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz, Manaus. E edição dos eletroferogramas gerados foi realizada com o auxílio do programa BioEdit v7.2.5. Sequências de referência correspondentes a região genômica dos *Its* foram comparadas com outras regiões depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pela ferramenta BLAST. As sequências que obtiveram boa qualidade foram submetidas à análise filogenética através dos softwares: MUSCLE, Gblocks, PhyML, TreeDyn.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 82 isolados reativados, 26 amostras apresentaram viabilidade, dentre essas, 11 amostras tiveram seu DNA sequenciado, porém, apenas 4 amostras apresentaram sequencias que possibilitaram a análise filogenética. A árvore com os resultados observa-se na Figura 1.

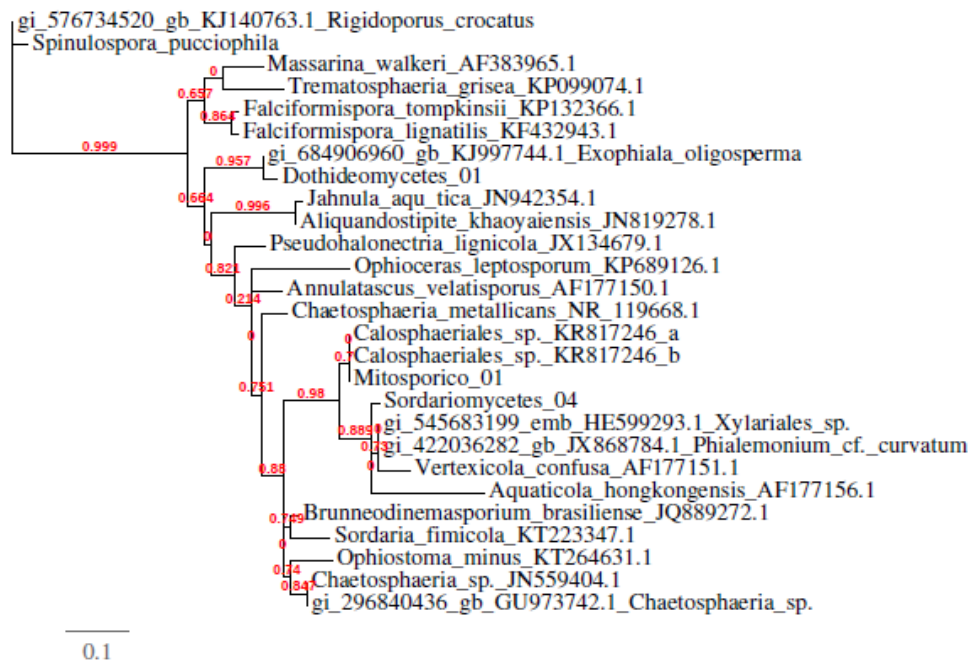


Figura 1. Árvore filogenética das amostras sequenciadas e suas similaridades.

Os representantes do filo Basidiomycota estão divididos em três classes/subfilos: Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina. Esses organismos são considerados cosmopolitas que vivem predominantemente em ambiente terrestre, mas, podem ocorrer em ambiente aquático. Popularmente conhecidos como cogumelos, tem como característica principal a presença de basídio contendo basidiósporos. São miceliais, podendo, ser unicelulares ou pseudomiceliais. A reprodução é sexuada e ou assexuada. São sapróbios, porém, alguns são parasitas de animais, algas, vegetais e de outros fungos (Hibbett *et al.* 2007; Kirk *et al.* 2008). Amostra *Spinulospora pucciophila* apresentou 90% de similaridade com o fungo *Rigidoporus crocatus*, e seu posicionamento na árvore filogenética demonstra a alta similaridade entre essas espécies.

A classe Dothideomycetes do filo Ascomycota, apresenta o ascomata na forma de cleistotécio ou peritécio com ascos bitunicados ou fissitunicados. Ecologicamente, podem ser patógenos de vegetais, endófitos ou sapróbios. Crescem em restos de madeira e folhas em decomposição (Spatafora *et al.* 2006). As espécies de água doce correspondem a aproximadamente 30% dos Ascomycetes aquáticos e pertencem ao táxon Pleosporomycetidae, principalmente nas ordens Pleosporales e Jahnulales (Shearer *et al.* 2009). Os Dothideomycetes mais descritos em ambientes de água doce são *Jahnula* e *Mamillisphaeria* (Vijaykrishna *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006). No presente trabalho a amostra Dothideomycete 1 apresentou 99% de similaridade com o fungo *Exophiala oligosperma*, e sua localização na árvore filogenética indica alta similaridade entre os microrganismos.

Fungos Anamorfos ou Mitospóricos tem como característica principal a reprodução assexuada, onde ocorre a produção de conídios. Podem ter a forma filamentosa ou leveduriforme, onde a reprodução é por brotamento e formação de pseudomicélio. Nos ecossistemas são sapróbios, parasitas e mutualistas. Neste grupo encontram-se os Hifomicetos aquáticos, os quais apresentam os conídios hidrodinâmicos ou tetra radiados, classificados como fungos ingoldianos e aeroaquáticos, são cosmopolitas, mas predominando em ambientes lóticos (Shearer *et al.* 2007; Barlocher 2009; Krauss *et al.* 2011; Jones e Pang 2012). No presente trabalho, a amostra Mitosporico 1 apresentou 100% de similaridade com a classe *Calosphaeriales* sp., e sua posição na árvore indica alta semelhança entre esses microrganismos.

A classe Sordariomycetes do filo Ascomycota é a mais importante entre os fungos de água doce. Na atual classificação, encontram-se três subclasses a Hypocreomycetidae, Sordariomycetidae e Xylariomycetidae. Apresenta ascoma em forma de peritécio ou com menos frequência cleistotécio, os ascos são inoperculados e unitunicados ou prototunicados. A presença ou ausência de um anel apical (amilóide ou não amilóide) é uma característica importante na classificação. Esses são organismos cosmopolitas e atuam em quase todos os ecossistemas como sapróbios, agentes patogênicos, endofíticos e parasitas, de artrópodes, mamíferos e fungos (Zhang *et al.* 2006; Kirk *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009). Os gêneros, pertencentes aos Sordariomycetes, exclusivos de água doce são *Aquaticola*, *Cataractispora*, *Pseudoproboscispora*, *Rivulicola* e *Torrentispora* e os Dothideomycetes mais descritos são *Jahnula* e *Mamillisphaeria* (Vijaykrishna *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006). No presente trabalho a amostra Sordariomycete 4 apresentou 97% de similaridade com *Aquaticola hogkongensis*, e sua localização na árvore filogenética indica alta similaridade entre os microrganismos.

CONCLUSÃO

Através da aplicação da metodologia de sequenciamento das regiões ITS do rDNA de 11 amostras obteve-se 4 sequenciamentos satisfatórios, possibilitando um alinhamento a nível de gênero e classe, demonstrando-se que a técnica é satisfatória para encontrar correlação genética de microorganismos pouco conhecidos.

REFERÊNCIAS

- Barlocher, F. 2009. Reproduction and dispersal in aquatic hyphomycetes. *Mycoscience*, 3– 8.
- Dong, J.-Y. *et al.* 2009. Colomitides A and B: novel ketals with an unusual 2,7- dioxabicyclo[3.2.1]octane ring system from the aquatic fungus YMF 1.01029. *Chemistry & biodiversity*, 6(8): 1216–1223.
- Hibbett, D.S. *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5): 509–547.
- Kirk, P.M. *et al.* 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Tenth ed. Trowbridge: CAB International. p. 72.
- Spatafora, J.W. *et al.* 2006. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia*, 98(6): 1018-1028.
- Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Vijaykrishna, D.; Jeewon, R.; Hyde, K.D. 2006. Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity*, 351-390.
- Zhang, N. *et al.* 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a fourgene phylogeny. *Mycologia*, 98(6): 1076–1087.