



Identificação molecular de fungos endofíticos do *Bambusa oldhamii*

Munro

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Bambusa oldhamii* MUNRO ENDOPHYTIC FUNGI

Raquel Nobre Silva (orientado)*, Juliana Vitória Messias Bittencourt (orientador)†,

Ana Paula de Azevedo Pasqualini‡,

Mariana Machado Fidelis do Nascimento§, Shelen Ponchielli Thomaz¶, Lucas Emanuel Pereira

Barreto¹

RESUMO

A identificação molecular de microrganismos é uma ferramenta muito importante dentro da biologia molecular. Essa importância se dá, pois a partir dela é possível conhecer o microrganismo estudado, permitindo ao pesquisador o conhecimento de suas características e quais ferramentas utilizar para maior precisão do estudo que pretende ser realizado com o microrganismo. Além disso, a manutenção do material biológico, seja por repique, liofilização, dentre outras técnicas, também é essencial para manter a viabilidade celular dos microrganismos. Por isso, o objetivo deste trabalho foi comparar as sequências de DNA de fungos endofíticos depositados na Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP) com os dados presentes nas duas coleções de cultura do Westerdijk Fungal Biodiversity Centre e do National Center for Biotechnology Information (NCBI), a fim de analisar a compatibilidade das espécies entre os bancos de dados e a sequência de rDNA armazenada. Para isso, utilizou-se o software Bioedit e a base de dados microbiológicos citados acima, onde foram feitas as comparações das 19 sequências de DNA fúngicos. E para que os microrganismos depositados mantivessem suas características morfológicas e genéticas originais, foi realizada a manutenção do material biológico dos fungos presentes na CRMP da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus de Ponta Grossa.

Palavras-chave: manutenção, viabilidade celular, biologia molecular, espécies, DNA.

ABSTRACT

Molecular identification of microorganisms it's a very important tool in molecular biology. This importance is given, because it is possible to know the studied microorganism, allowing the researcher to know its characteristics and which tools to use for greater precision in the study that intends to be carried out with the microorganism. In addition, the maintenance of biological material, either by replenishing, lyophilization, among other techniques, is also essential for the cellular viability of microorganisms. Therefore, the objective of his work was to compare the DNA sequences of endophytic fungi deposited in the Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP) with the data present in the two culture collections of the Westerdijk Fungal Biodiversity Center and the National Center for Biotechnology Information (NCBI), in order to analyze the species compatibility between the databases and the stored rDNA sequence. For this, the Bioedit software and the microbiological database mentioned above were used, where comparisons of the 19 fungal DNA sequences were made. And so that the deposited microorganisms kept their original morphological and genetic characteristics, the biological material of the fungi present in the CMRP of Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Ponta Grossa campus, was maintained.

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; raquel.1998@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa; julianavitoria@professores.utfpr.edu.br

‡ Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil; anapauladeazevedo@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; marifideliss@gmail.com

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; shelent34@gmail.com

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; lucasbarreto477@gmail.com

Keywords: maintenance, cell viability, endophytic, molecular biology, species, DNA.

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade de fungos é enorme, dentre as 140 mil espécies conhecidas (XU, 2020), destes, apenas 200 espécies são patogênicas, o que mostra uma ampla variedade de fungos que podem ter importância para a biotecnologia e algumas indústrias, como alimentícia, farmacêutica e agrícola (TORTORA, FUNKE, CASE, 2016). São organismos eucariontes, heterotróficos, e possuem em sua estrutura hifas, filamentos de células que formam o micélio. Podem ter natureza sapróbia, parasítica ou simbiótica (CROUS et al., 2009). Dentre os fungos de natureza simbiótica, podemos citar os fungos endofíticos, que vivem em simbiose com plantas, habitando órgãos e tecidos vegetais sem causar aparente dano aos hospedeiros. (AZEVEDO, 1998).

Por este motivo, as ferramentas da biologia molecular como o conhecimento das sequências de ácidos nucleicos (DNA) são essenciais para obter informações como muito utilizadas na identificação do microrganismo, como: sua estrutura, função e relação evolutiva com outros genes - árvore filogenética. (BORSUK, 2016).

Fungos endofíticos isolados em *Bambu oldhamii* a partir de colmos de plantas adultas, com 9 anos de idade, coletados na localidade da Estação Experimental Canguiri da UFPR, no município de Pinhais, região metropolitana de Curitiba/PR (25°23'11.8"S 49°07'33.9"W) foram depositados na coleção CMRP e utilizados nesta pesquisa. (PASQUALINI, 2019)

Diante do exposto, a problemática a ser resolvida no presente trabalho foi: como garantir que as espécies analisadas há dois anos ainda são compatíveis? Para isso, a pesquisa teve como objetivo realizar a comparação entre as sequências de DNA de fungos endofíticos do Bambu (*Bambusa oldhamii* Munro) depositados na CMRP, com os dados depositados na Coleção de Culturas do Westerdijk Fungal Biodiversity Centre e do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Foi registrado então as possíveis mudanças entre as espécies, em decorrência das atualizações constantes feitas nestes bancos de dados.

2. MÉTODO

2.1 Material biológico

Foram estudadas as linhagens de fungos endofíticos do bambu (*Bambusa oldhamii* Munro), depositados na Coleção Microbiológica da Rede Paranaense, dados pelas linhagens de fungostratadas a partir do sequenciamento da região ITS com os seguintes registros: CMRP 3286, 3287, 3288, 3289, 3290, 3291, 3292, 3293, 3294, 3295, 3296, 3297, 3298, 3299, 3300, 3301, 3302, 3303 e 3304.

Coleções microbiológicas são dinâmicas, portanto necessitam de tratamento constante para manter sua viabilidade celular e suas características morfológicas e genéticas, por isso o repique contínuo dos materiais citados acima se faz necessário. Desta forma, o primeiro desafio a ser resolvido foi saber se o material conservado estava viável, uma vez que o agravamento da pandemia impossibilitou este tratamento, trazendo vulnerabilidade para os materiais biológicos armazenados.

A fim de recuperar o material biológico armazenado na coleção citada acima, realizou-se o resgate de 15 dos 19 materiais biológicos dos fungos endofíticos depositados na CMRP. Alguns deles estavam inativos em óleo mineral com as seguintes identificações CMRP 3287, 3288, 3291, 3295, 3296, 3297, 3299, 3301, 3302 e 3304 através de repique por estriamento contínuo em meio BDA (Ágar Batata Dextrose). Então, as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 7 dias. Após este período de incubação foram analisados o crescimento dos fungos e armazenados na coleção.

Em seguida, os cinco fungos registrados como CMRP 3289, 3294, 3300, 3303 e 3305 que estavam em placas de petri e biologicamente inativos foram tratados com a adição de 0,1 mL do antibiótico cloranfenicol em meio Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e repicados em duplicata em placas com Ágar Batata Dextrose (BDA) por dois métodos distintos: uma placa por estriamento contínuo e a outra com amostra de 100 µL coletada do material biológico em suspensão. O material tratado foi incubado em estufa a 28°C de 7 dias a 10 dias para análise do seu crescimento. Após o período de incubação, os mesmos foram armazenados na coleção de cultura.

2.2 Tratamento das sequências e alinhamento

A técnica para identificação dos fungos endofíticos do *Bambusa oldhamii* Munro foi o alinhamento e blasting, visando a comparação das sequências de nucleotídeos presentes na tese de Pasqualini (2019) entre os bancos de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) e da Coleção de Culturas do Westerdijk Fungal Biodiversity Centre, finalizando a identificação taxonômica dos fungos em estudo.

Para análise e alinhamento das sequências de DNA foi utilizado o software Bioedit, tratando as 19 sequências citadas acima no item 2.1. O tratamento das sequências foi feito a fim de obter a sequência consenso, removendo as extremidades do locus gênico com bases nitrogenadas de baixa qualidade (NILSSON et al, 2012, p.43). Após o alinhamento, foi possível comparar as sequências consensos obtidas com as sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) através da ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e também com o instituto Westerdijk (<https://wi.knaw.nl/>). Os resultados obtidos foram documentados na Tab. 2 e comparados entre os dois bancos de dados citados acima, apresentando a similaridade entre os fragmentos de DNA depositados.

3. RESULTADOS

A recuperação do material biológico dos fungos depositados na coleção de culturas CMRP, garantiu a vitalidade celular de 15 microrganismos dos 19 depositados, dados por CMRP 3287, 3288, 3289, 3291, 3294, 3295, 3296, 3297, 3299, 3300, 3301, 3302, 3303, 3304 e 3305. Portanto, estes foram novamente armazenados a fim de preservar suas características originais. No entanto, quatro dos 19 materiais biológicos não foram passíveis da recuperação celular devido ao tempo que ficaram sem manutenção, devido ao Covid-19.

A partir das sequências de DNA previamente extraídos e armazenados no banco de dados da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP/UTFPR-PG) vinculada a Rede Paranaense CMRP (Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense - Taxonline), foi possível realizar a identificação molecular das linhagens de fungos endofíticos do bambu da pesquisa de Pasqualini (2019).

Das 19 sequências tratadas, foi possível verificar que o alinhamento de 18 sequências de DNA em estudo, mostrou-se eficiente, uma vez que a porcentagem de similaridade com os acessos depositados no NCBI teve “Max Ident” de quase 100%. No entanto, apenas um dos acessos com registro CMRP 3303 não obteve sucesso na leitura do fragmento para tratamento da sequência. Isso pode ter ocorrido por diversos fatores, de acordo com Nilsson et al (2012), provavelmente por ter uma baixa qualidade de leitura dos pares de bases ou por representar outros genes ou outros marcadores além do ITS.

O parâmetro utilizado para comparação “Max Ident” do BLASTn que corresponde na Tab. 2 à “% de identificação”, nada mais é do que a identidade máxima da sequência estudada com os dados depositados no

NCBI. É obtida por um HSP (High-scoring Segment Pairs), sendo a região do segmento com maior similaridade de pares de bases nitrogenadas (FASSLER e COOPER, 2011).

Tabela 2 - Comparação dos fungos tratados e depositados na CMRP com o banco de dados do NCBI e com o banco de dados Westerdijk Fungal

N° na coleção CMRP	Acesso no NCBI	Acesso no Westerdijk	Espécies identificadas pelo NCBI (% identificação)	Espécies identificadas pelo Westedijk Fungal Biodiversity Centre (% identificação)
CMRP 3286	NR_155973.	SH1525102.08FU	<i>Wojnowiciella leptocarpi</i> (94,35%)	<i>Wojnowicia sp.</i> (97,05%)
CMRP 3287	AM084368.1	SH1541120.08FU	<i>Xylaria enteroleuca</i> (100%)	<i>Xylaria enteroleuca</i> (100%)
CMRP 3288	MK120555.1	SH1540603.08FU	<i>Diaporthe sp.</i> (100%)	<i>Diaporthe sp.</i> (94,74%)
CMRP 3289	MT539137.1	SH1563658.08FU	<i>Pestalotiopsis sp.</i> (98,85%)	<i>Pestalotiopsis microspore</i> (100%)
CMRP 3290	KX378907.1	SH1540045.08FU	<i>Arthrinium sp.</i> (100%)	<i>Arthrinium sp.</i> (100%)
CMRP 3291	KX015984.1	SH1540045.08FU	<i>Arthrinium sp.</i> (99,58%)	<i>Arthrinium sp.</i> (99,58%)
CMRP 3292	KU535827.1	SH1541119.08FU	<i>Ascomycota sp.</i> (99,72%)	<i>Ascomycota sp</i> (99,72%)
CMRP 3293	MG020377.1	SH1540603.08FU	<i>Diaporthe oxe</i> (98,47%)	<i>Diaporthe sp.</i> (97,12%)
CMRP 3294	KM265825.1	SH1238789.08FU	<i>Fungal sp.</i> (94,34%)	<i>Fungal sp.</i> (92,67%)
CMRP 3295	KU710251.1	SH1547058.08FU	<i>Phoma herbarum</i> (100%)	<i>Phoma herbarum</i> (99,79%)
CMRP 3296	MT322117.1	SH1610160.08FU	<i>Fusarium asiaticum</i> (100%)	<i>Fusarium sp.</i> (100%)
CMRP 3297	KU839398.1	SH1540050.08FU	<i>Fungal sp.</i> (100%)	<i>Fungal sp.</i> (100%)
CMRP 3298	KT328870.1	SH1235300.08FU	<i>uncultured fungus</i> (99,15%)	<i>Phaeosphaeriaceae sp.</i> (99,15%)
CMRP 3299	KX015984.1	SH1540045.08FU	<i>Arthrinium sp.</i> (100%)	<i>Arthrinium sp.</i> (100%)
CMRP 3300	KT328870.1	SH1235300.08FU	<i>uncultured fungus</i> (97,64%)	<i>Phaeosphaeriaceae sp</i> (100%)
CMRP 3301	MN592969.1	SH1525124.08FU	<i>Leptosphaeria sp.</i> (99,28%)	<i>Leptosphaeria sp.</i> (99,75%)

CMRP 3302	KF436392.1	SH1540045.08FU	<i>Fungal endophyte</i> (95,08)	<i>Fungi unidentified</i> (94,56%)
CMRP 3304	AB985781.1	CNRMA18.594 - Fungi bank database: Institute Pasteur	<i>Fusarium sp. DBF</i> (96,76%)	<i>Fusarium kyushuense</i> (97,86%)

Fonte: autoria própria (2021)

A Tab. 2, apresenta a relação da porcentagem de similaridade com as sequências tratadas e as espécies depositadas nos bancos de dados do NCBI e do Westerdijk Fungal Biodiversity Centre. A comparação mostra que as espécies foram bastante similares entre si. As identificações que apresentaram similaridade de espécies e mesma porcentagem, obteve-se os registros: CMRP 3287, CMRP 3290, CMRP 3291, CMRP 3292, CMRP 3297 e CMRP 3299. Outros registros que apresentaram a mesma espécie ou pertencentes ao mesmo gênero mas com a porcentagem diferente entre si, ainda que acima de 94,35%, foram: CMRP 3286, CMRP 3288, CMRP 3289, CMRP 3293, CMRP 3294, CMRP 3295, CMRP 3296, CMRP 3301 e CMRP 3304. As sequências registradas como: CMRP 3298, CMRP 3300 e CMRP 3302, divergiram entre as espécies, apesar das porcentagens serem altas.

Os resultados foram satisfatórios, já que não houveram porcentagens abaixo de 90% de similaridade e a maioria dos registros corresponderam às mesmas espécies entre os dois bancos de dados. Por outro lado, as pequenas diferenças entre algumas comparações realizadas, podem ter ocorrido pelo fato do GenBank, banco de dados do NCBI, ser uma base de dados que engloba mais de 260.000 espécies, classificadas em diferentes microrganismos, e não somente fungos. (Benson et al, 2013). Já o banco de dados Mycobank, correspondente ao Westerdijk Fungal Biodiversity Centre, armazena informações apenas das diversas espécies de fungos existentes, podendo ser um critério mais específico na análise das identificações. Além disso, as sequências dadas por CMRP 3298 e CMRP 3300, foram identificadas como *uncultured fungus*, pois pode ter sido utilizado no momento da cultura dos microrganismos a aplicação de técnicas independentes (metagenômica) para conhecer a microbiota de um determinado ambiente. (FILHO, 2010)

4. CONCLUSÃO

As comparações de uma forma geral foram bem sucedidas. Sendo assim, as identificações dos materiais comparados mostraram ser similares entre si, seja entre espécies ou em porcentagens acima de 90%. Isso indica que, devido ao grande fluxo de informações inseridos nos bancos de dados analisados constantemente, é necessário realizar atualizações constantes nas comparações entre as sequências analisadas.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Ponta Grossa, ao programa Fundação Araucária pelo apoio financeiro recebido para o desenvolvimento desta pesquisa, a minha orientadora Juliana Vitória Messias Bittencourt, as Doutoradas Ana Paula de Azevedo Pasqualini e Mariana Machado Fidelis e ao apoio dos alunos envolvidos na CMRP: Shelen Ponchielli Thomaz e Lucas Emanuel Pereira Barreto.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. Capítulo 4. p. 117-137. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. 1998.

BENSON et al. **Genbank**. Nucleic Acids Res. Jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193287/>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

BORSUK, Sibeles. **Caracterização molecular de parasitas de importância em saúde pública: Aplicações e Conceitos**. Novas edições acadêmicas, 2016.

CROUS, Pedro W, COCK, Arthur W A M de. **Fungal Biodiversity**. Canadá. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre. 2009.

FASSLER, Jan, COOPER, Peter. **BLAST® Help: BLAST Glossary**. Estados Unidos, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>>. Acesso em: 13 mai. 2021.

FILHO, Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa. **Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado**. Embrapa Cerrados. 2010. Planaltina, Distrito Federal. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77779/1/doc-284.pdf>>. Acesso em: 01. set. 2021.

NILSSON RH, Tedersoo L, Abarenkov K, Ryberg M, Kristiansson E, Hartmann M, Schoch CL, Nylander JAA, Bergsten J, Porter TM, Jumpponen A, Vaishampayan P, Ovaskainen O, Hallenberg N, Bengtsson-Palme J, Eriksson KM, Larsson K-H, Larsson E, Kõljalg U. **Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences**. 2012. p.37–63. Disponível em <<https://www.dora.lib4ri.ch/wsl/islandora/object/wsl%3A9537>>. Acesso em 19 jul. 2021.

PASQUALINI, Ana Paula de Azevedo. **Subsídios para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de *Bambusa oldhamii* Munro: estudos de microrganismos associados e aspectos morfoanatômicos**. Curitiba, 2019. Disponível em: <[https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/gerenciadownload?op=download&doc=28937_2019_24_76_2_\(*\)&idPessoa=28937&idPrograma=40001016031P6&nivelP=Pessoa&isMatch=false](https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/gerenciadownload?op=download&doc=28937_2019_24_76_2_(*)&idPessoa=28937&idPrograma=40001016031P6&nivelP=Pessoa&isMatch=false)>. Acesso em: 12 abr. 2021.

TORTORA, Gerald J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016. p.264.

XU, Jianping. **Fungal Species Concepts in the genomics era**. Genome. Vol. 63, nº3, set. 2020. Disponível em <<https://cdsciencepub.com/doi/full/10.1139/gen-2020-0022>>. Acesso em: 19 jul. 2021.