

## Primeira ocorrência do fungo *Sarcoporia polyspora* em plantação de *Pinus* sp. na América do Sul

Daiana Bortoluzzi Baldoni<sup>(2)</sup>; Luana Orlandi<sup>(3)</sup>; Talita Ferreira<sup>(4)</sup>; Gilberto Coelho<sup>(5)</sup>; Rodrigo Josemar Seminoti Jacques<sup>(6)</sup>; Zaida Inês Antonioli<sup>(7)</sup>

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPq

<sup>(2)</sup> Doutoranda em Ciência do Solo; Universidade Federal de Santa Maria; Santa Maria, Rio Grande do Sul (daianabio@hotmail.com); <sup>(3)</sup> Estudante graduação em Agronomia, UFSM; <sup>(4)</sup> Estudante do curso de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina <sup>(5)</sup> Professor Adjunto do Centro de Educação, UFSM; <sup>(7)</sup> Professora Associada do Departamento de Solos, UFSM.

**RESUMO:** Os fungos degradadores de madeira podem degradar polímeros complexos no solo como a lignina e a celulose, o que torna sua atividade muito importante para a formação da matéria orgânica no solo em ambientes florestais. Entretanto, são poucos os estudos envolvendo os fungos degradadores de podridão marrom. Diante disso objetivou-se identificar uma espécie de fungo de podridão marrom presente em uma área de cultivo de *Pinus* sp. na FEPAGRO/Florestas em Santa Maria, RS. Os 3 espécimens coletados foram identificados por ferramentas de biologia molecular como *Sarcoporia polyspora*, sendo sua primeira ocorrência para a América do Sul. A situação filogenética desse fungo ainda continua não resolvida pelos métodos utilizados até o momento.

**Termos de indexação:** podridão marrom, fungos degradadores, matéria orgânica.

### INTRODUÇÃO

Entre os habitats terrestres, o solo é o que contém maior diversidade biológica, refletindo-se em grande diversidade metabólica, responsável pela realização de muitos processos essenciais ao funcionamento dos ecossistemas naturais ou manejados (Jesus & Moreira, 2008). Dentre as muitas atividades desenvolvidas pelos microrganismos neste ambiente, destaca-se a degradação de polímeros complexos no solo, como a lignina e a celulose contribuindo dessa forma para a formação da matéria orgânica no solo.

No entanto, poucos microrganismos do solo possuem essa capacidade, o que torna o metabolismo desses organismos extremamente importante para o ambiente e para a biotecnologia. Segundo Kirk & Cullen (1998) a biodegradação de materiais lignocelulósicos no solo constitui uma das etapas mais importantes do ciclo do carbono da natureza. O principal grupo de microrganismos que efetuam essa atividade no solo são os fungos degradadores de madeira.

De acordo com o tipo de degradação, os fungos degradadores podem ser classificados em fungos causadores da podridão branca atuando simultaneamente sobre a lignina, a celulose, e a

hemicelulose; e em fungos causadores da podridão marrom, efetivos na degradação dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, mas pouco eficientes na degradação de lignina (Alexopoulos et al., 1996).

Os sistemas degradativos de espécies de podridão branca têm sido intensivamente estudados, em razão do elevado potencial de utilização em aplicações biotecnológicas, como na biodegradação de compostos xenobióticos (Rabinovich et al., 2004), na decomposição de resíduos madeireiros (Van Heerden et al., 2008), na biopolpação da madeira (Ferraz et al., 2008) e no bi branqueamento de polpas celulósicas (Milagres et al., 2002).

Entretanto são escassos os estudos de taxonomia e aplicações biotecnológicas envolvendo fungos de podridão marrom no Sul do Brasil. O conhecimento de novas espécies de fungos de podridão marrom torna-se importante para os processos de biodegradação de materiais recalcitrantes com alto teor de lignina (pela modificação estrutural) e celulose no solo (biodegradação). Diante disso, esse trabalho teve como objetivo identificar uma espécie de fungo degradador de podridão marrom presente em uma área de cultivo de *Pinus* sp. na FEPAGRO/Florestas em Santa Maria, Rio Grande do Sul.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Obtenção de Basidiomas

Os basidiomas de um fungo de podridão marrom foram coletados em uma área cultivada com *Pinus* sp. na FEPAGRO/Florestas, em Santa Maria, Rio Grande do Sul em novembro de 2011. As amostras foram observadas, fotografadas, acondicionadas em potes de plástico e após, foram transportadas até o Laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia do Ambiente Professor Marcos Rubens Fries no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, para identificação por ferramentas de biologia molecular. Os 3 basidiomas coletados foram identificados inicialmente como DBB29, DBB30 e DBB33.

### Análise molecular

O DNA foi extraído a partir de alíquotas dos basidiomas usando o kit DNeasy Plant Mini Kit® (Qiagen, São Paulo, Brasil). A completa região do nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2) foi amplificada com os primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). A reação de amplificação dos fragmentos do nrDNA foi realizada segundo Baldoni et al. (2012). Após a amplificação, a eletroforese foi realizada para verificar a amplificação em gel de agarose a 1,5% e tampão TBE 1X. As amostras de DNA foram coradas com BlueGreen Loading Dye I® (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e observadas em luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com o kit Gen Elute PCR clean-up Kit® (Sigma, Saint Louis, USA), seguindo as instruções do fabricante.

O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### Identificação molecular e reconstrução filogenética

Os fragmentos seqüenciados foram analisados utilizando o programa Staden Package 2.0.0b (Staden et al., 2003) para a obtenção das seqüências consenso.

As seqüências foram alinhadas no programa MAFFT 6.0 (Kato et al., 2002), utilizando o algoritmo E-ins-i.

A relação filogenética dos espécimes foi reconstruída com base em análises da região ITS no software MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011), com a análise de Máxima Verossimilhança (ML) em um total de 1000 replicações para todas as reconstruções. O modelo de substituição de nucleotídeos Tamura-Nei Model foi estimado utilizando JModelTest como melhor modelo para resolver os dados (Posada et al., 2006), executado com taxas uniformes e parâmetros de exclusão parcial (95%). As seqüências de *Tremella globispora* (AF444432) e *Tremella cinnabarina* (AF444430) foram utilizados como grupo externo. Para a reconstrução filogenética também foram utilizadas seqüências retiradas do GenBank de outros fungos degradadores de madeira (**Figura 1**).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 3 espécimes coletados (DBB29, DBB30 e DBB33) são fungos causadores de podridão marrom e possuem elevada similaridade com os espécimes de *Sarcoporia polyspora* registrados para o Leste dos Estados Unidos, (**Figura 1**), indicando uma origem coespecífica e confirmando a presença

desta espécie pela primeira vez na América do Sul.

*Sarcoporia polyspora* P. Karst. é fungo poliporóide de podridão marrom agressivo na degradação da madeira, que é caracterizada pela produção de basidiomas ressupinados branco-marrons, sistema hifal monomítico com fíbulas e esporos dextrinóides. Atualmente, *Sarcoporia polyspora* está incluído na família Fomitopsidaceae Jülich (Kirk et al., 2008).

Apesar de não ter sido localizado relatos sobre aplicações biotecnológicas de *Sarcoporia polyspora*, alguns estudos mostram a grande capacidade de utilização de fungos degradadores de podridão marrom para biorremediação do solo (Purmono et al., 2011) e para a biodegradação de compostos xenobióticos (Monroy et al., 2006).

Em termos da relação evolutiva entre *Sarcoporia* e outros fungos degradadores de madeira, vários estudos filogenéticos têm posicionado *Sarcoporia polyspora* (*Parmastomyces transmutans*), no clado poliporóide ou no clado das Antrodias, relacionado com outros fungos de podridão marrom. Hibbett e Binder (2002) baseado em SSU-nrDNA (133 espécies) colocou-o dentro do clado polyporoide. Enquanto no estudo multi-locus realizada por Binder et al. (2005), (656 espécies) *S. polyspora* ficou agrupado dentro do clado das Antrodias. No estudo de Lindner e Banik (2008) (seqüências nrLSU) também apareceu como parte do clado Antrodias aparentemente relacionados com *Grifola frondosa* (podridão branca). No estudo de Yu et al. (2010) com base em seqüências parciais de LSU nrDNA, *S. polyspora* apareceu mais estreitamente relacionado com os gêneros *Auriporia*, *Amylocystis*, *Oligoporus* e *Taiwanofungus*, do que para os gêneros *Antrodia*, *Daedalea*, *Fibroporia*, *Fomitopsis*, *Piptoporus*, e *Neolentiporus*. Recentemente, no estudo de Ortiz-Santana et al. (2013), utilizando nuclear LSU e ITS rDNA, os isolados de *S. polyspora* se agruparam com isolados de *Auriporia* e *Taiwanofungus* e apareceram relacionados com um clado contendo isolados *Amylocystis* e *Dacryobolus*, no entanto uma vez que esses grupos não foram estatisticamente sempre apoiados a relação entre *Sarcoporia* e outros fungos de podridão marrom continua não resolvida.

## CONCLUSÕES

Os 3 espécimes de fungo de podridão marrom identificados como *Sarcoporia polyspora* representam a primeira ocorrência dessa espécie para a América do Sul e sua relação filogenética continua não resolvida.

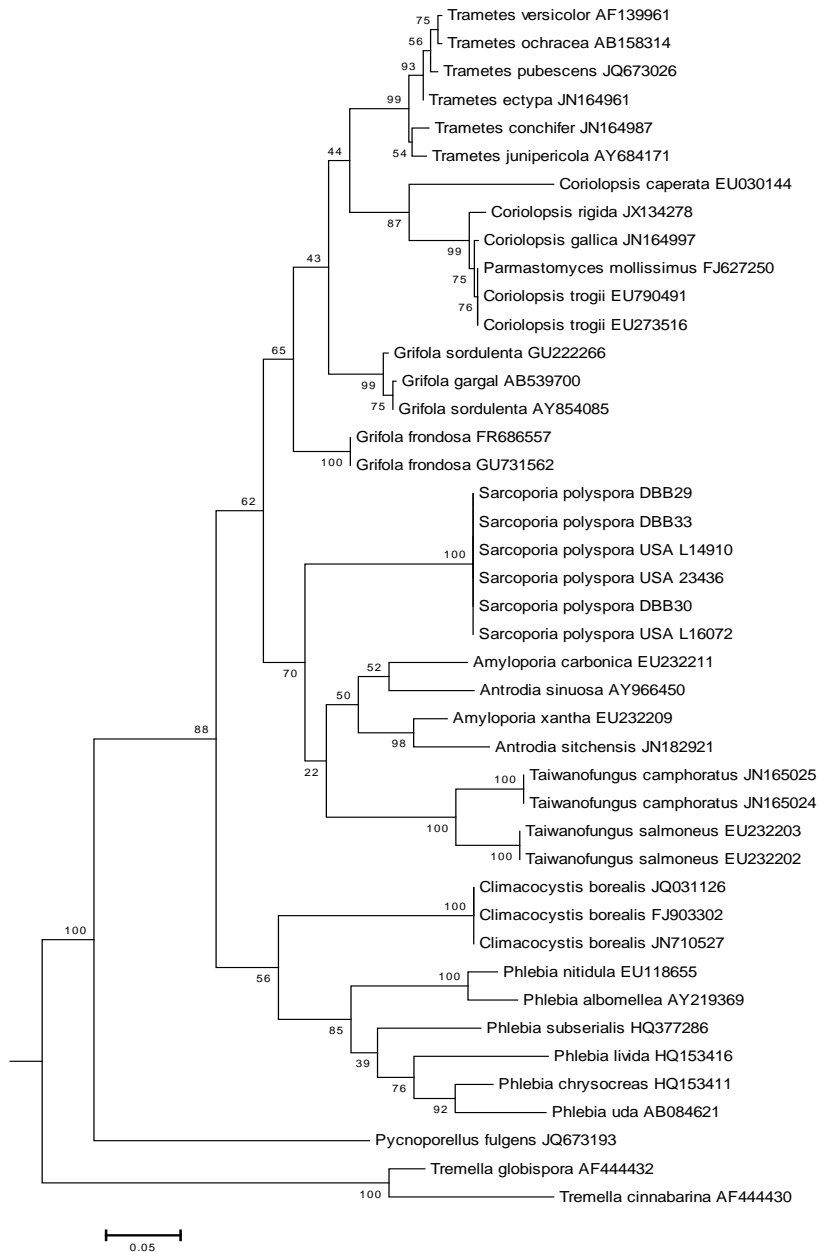


## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brasil) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brasil) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS C. J.; MIMS C. W & BLACKWELL M. Introductory Mycology. 4ed. New York: John Wiley & Sons. 1996. 869p.
- BINDER M.; HIBBETT, D. S.; LARSSON, K. H.; LARSSON, E.; LANGER, E.; LANGER, G. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Systematics and Biodiversity* 3(2):1–45, 2005.
- BALDONI, D. B.; COELHO, G.; JACQUES R. J. S.; SILVEIRA, R. M. B.; GREBENC, T.; ANTONIOLLI, Z. I. Brown rotting fungus closely related to *Pseudomerulius curtisii* (Boletales) recorded for the first time in South America. *Mycosphere* 3(5):533–541, 2012.
- FERRAZ, A.; GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; MASARIN, F.; VICENTIM, M.P.; AGUIAR, A.; PAVAN, P.C. *Enzyme Microbial Technology*, 43(2):178-185, 2008.
- GILBERTSON, R. L. & RYVARDEN, L. North American polypores. *Megasporoporia – Wrightoporia*. *Fungiflora*, (2):434–885, 1987.
- HIBBETT, D. S. & BINDER, M. Evolution of complex fruiting-body morphologies in homobasidiomycetes. *Proceedings of the Royal Society B*, (269):1963–1969, 2002.
- JESUS, E. C. & MOREIRA, F. M. S. M. Métodos moleculares para o estudo de comunidades de bactérias do solo. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. *Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros*. Lavras: UFLA, 2008. p.681-738.
- KATO, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14):3059–3066, 2002.
- KIRK, T. K. & CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York: John Wiley and Sons, 1998, p.273-308.
- KIRK P. M.; CANNON P. F.; MINTER D. W.; STALPERS J. A. *Dictionary of the Fungi*, 10 ed. CABI Europe, 2008. 771 p.
- LINDNER, D. L. & BANIK, M. T. Molecular phylogeny of *Laetiporus* and other brown rot polypore genera in North America. *Mycologia*, 100(3):417–430, 2008.
- MILAGRES, A. M. F.; ARANTES, V.; MEDEIROS, C. L.; MACHUCA, A. *Enzyme Microbial. Technology*. 30:562-565, 2002.
- MONRROY, M.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Degradation of tribromophenol by wood-rot fungi and hamilton system. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3):253-257, 2006.
- ORTIZ, S. B.; LINDNER, D. L.; MIETTINEN, O.; JUSTO, A.; HIBBETT, D. S. A phylogenetic overview of the antrodia clade (Basidiomycota, Polyporales). *Mycologia* (In revision). 2013.
- POSADA, D.. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research*, 34:W700-W703, 2006.
- PURMONO, A. S.; MORI, T.; TAKAGI, K.; KONDO, R. Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, (65):691-695, 2011.
- RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASILCHENCO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(1)1-17, 2004.
- STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Analysing sequences using the staden package and EMBOSS. In: *Introduction to bioinformatics: A theoretical and practical approach*. Womble: Human Press Inc., 393–410, 2003.
- VAN HEERDEN, A.; ROUX, N. J. L.; SWART, J.; GARDNER-LUBBE, S.; BOTHA, A. Assessment of wood degradation by *Pycnoporus sanguineus* when co-cultured with selected fungi. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 24(11):2489-2497, 2008.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and Evolution*, 28(10):2731–2739, 2011.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press Inc.; 1990, p.315–322.
- YU, ZH.; WU, S. H.; WANG, D. M.; CHEN, C. T. Phylogenetic relationships of Antrodia species and related taxa based on analyses of nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Botanical Studies*, 51:53–60 2010.



**Figura 1** – Dendrograma da reconstrução filogenética baseada em Máxima Verossimilhança dos espécimes de *Sarcoporia polyspora* obtido a partir de seqüências ITS1-5.8S-ITS2 do nrDNA. Valores de bootstrap (em %) e 1000 replicações foram realizadas. As seqüências de *Tremella globispora* (AF444432) e *Tremella cinnabarina* (AF444430) foram utilizadas como grupo externo.