

## AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA POR ABORDAGEM POLIFÁSICA DE CULTURAS DE *PENICILLIUM* SUBGÊNERO *PENICILLIUM* PRESERVADAS NA MICOTECA URM

Ivana Roberta Gomes Alves de Souza Galvão<sup>1</sup>; Cristina Maria de Souza-Motta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais- CCB – UFPE; E-mail: ivanaggalvao@hotmail.com, <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Micologia – CCB – UFPE. E-mail: cristina.motta@ufpe.br

**Sumário:** A taxionomia clássica para identificação de espécies do gênero *Penicillium* é baseada em características macroscópicas, tais como a textura e desenvolvimento da colônia em meios de cultura padrões, bem como em características microscópicas e fisiológicas, tais como a temperatura de crescimento e a pigmentação das colônias. Estudos moleculares são importantes para avaliar a diversidade intra-específica destas linhagens. O objetivo deste trabalho foi identificar através da taxionomia clássica e por meio do sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e  $\beta$  tubulina 15 isolados pertencentes ao gênero *Penicillium* obtidos de solo de Mata atlântica de Pernambuco. Foram observadas as características macro e microscópicas para confirmação da taxionomia clássica e micélio jovem com três dias de crescimento foi utilizado para extração do DNA genômico e posteriormente amplificado as regiões ITS1-5.8S-ITS2, utilizando os primers ITS 1 e ITS 4, e  $\beta$  tubulina, utilizando os primers Bt2a e Bt2b. Os isolados selecionados apresentaram as características macro e microscópicas para as espécies *Penicilium citrinum*, *P. decubens*, *P. expansum*, *P. jantinelum*, *P. lividum*, *P. oxalicum*, *P. pnophilus*, *P. simplicissimu* e *P. waksmai*. Apenas um isolado - *Penicilium citrinum*, foi confirmado pelo sequenciamento das regiões ITS e  $\beta$ -tubulina do rDNA.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -tubulina, ITS, Identificação.

### INTRODUÇÃO

A taxonomia clássica do gênero *Penicillium* baseia-se na observação das características macroscópicas e microscópicas das espécies tais como cor do micélio variando entre os tons de amarelo, verde, vermelho e marrom, o reverso das colônias pode ser incolor, ou variar de tons de amarelo, verde, vermelho e marrom. Os isolados de algumas espécies podem produzir pigmentos que modificam a tonalidade do meio de cultura, podendo também produzir gotas de exudato de coloração diversas, são visualizadas macroscopicamente e considerados como critérios para fins taxonômicos. Microscopicamente, espécies de *Penicillium* observam-se hifas septadas. Essas hifas apresentam paredes desprovidas de pigmentação (Pitt, 1991). Os conidióforos surgem como ramos do micélio e são frequentemente perpendiculares ao substrato. Algumas espécies de *Penicillium* apresentam uma ramificação adicional, denominada râmulo, localizada entre a métula e o ramo (Onions; Brady, 1987; Pitt, 1991). É no interior das fiálides que os conídios são formados, geralmente em cadeia e de forma basípeta, isto é, o conídio mais velho ocupa o topo da cadeia (Raper; Thom, 1949). Os conídios são unicelulares, uninucleados, hialinos, pequenos, com formas que variam de globosas a cilíndricas. Devido a não existência de técnicas de identificação que funcionem com perfeição no reconhecimento das espécies, uma abordagem polifásica foi proposta há aproximadamente 35 anos (Samson; Varga, 2009). Essa abordagem polifásica é sugerida na separação de espécies, visando uma combinação de diferentes tipos ferramentas de

identificação como, por exemplo, morfologia, dados moleculares, fisiologia, perfis bioquímicos e dados ecológicos (Samson et al., 2007; Samson; Varga, 2009).

### MATERIAIS E MÉTODOS

A autenticação taxonômica clássica de 15 espécimes de *Penicillium* procedentes de solo de Mata Atlântica foi procedida de acordo com Pitt (1991). Os esporos de cada cultura de *Penicillium* foram suspensos numa solução de ágar e Tween 80. Desta suspensão, 2,0 µL foram inoculados em três pontos das placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA), Ágar Extrato de Malte (MEA) e 25% Ágar Glicerol (G25N) e incubados a 5°C, 25°C e 37°C para CYA e a 25°C para MEA e G25N. A identificação das espécies foram observadas características macroscópicas e microscópicas (Pitt, 1991; Samson & Frisvad, 2004).

Para a extração do DNA genômico foi realizada de acordo com Góes-Neto et al. (2005). As regiões ITS1 e ITS2 foram amplificadas utilizando os primers ITS 1 e ITS 4, como descrito por Varga et al. (2000) e White et al. (1990). E para a amplificação parcial do gene da  $\beta$ -tubulina foi utilizado os primers Bt2a e Bt2b, segundo Glass e Donaldson (1995) e Samson et al. (2004). Os produtos amplificados foram purificados com PureLink – PCR Purification Kit – Invitrogen e sequenciados na Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados e após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn.

### RESULTADOS

Os 15 isolados selecionados apresentaram as características macroscópicas e microscópicas foram descritas para as espécies *Penicillium citrinum*, *P. decubens*, *P. expansum*, *P. janthinellum*, *P. lividum*, *P. oxalicum*, *P. pnophilus*, *P. simplicissimu* e *P. waksmai* (Figura 1).

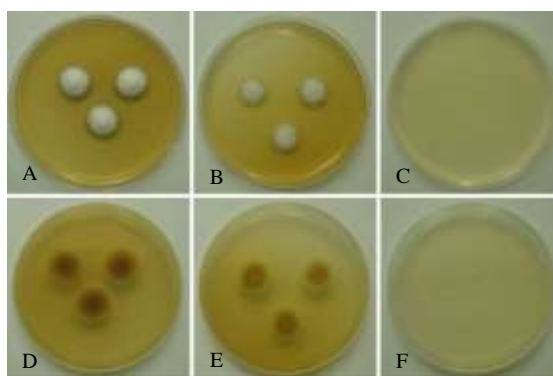


Figura 1: Características macroscópicas e microscópicas de *Penicillium janthinelum* Culturas incubadas por 7 dias a 25 °C sobre: A) CYA; B) MEA; C) G25N. D) reverso sobre CYA; E)reverso sobre MEA; F) reverso sobre G25N.

Apesar da divergência das entre a morfologia e os dados da biologia molecular, foram encontrados altos indices de identidade, e priorizadas as sequência com indice superior a 98%. Os dados moleculares revelaram que uma espécie está relacionadas com *P. citrinum*, sendo ela *Penicillium simplicissimum* e que *Penicillium lividum* tem relação com *Penicillium sclerotiorum*(tabela 1).

**Tabela 1.** Taxa identificados por características morfológicas e sequenciamento região ITS e  $\beta$ tubulina rDNA.

Identificação Morfológica	Identificação a partir do sequenciamento região ITS rDNA e potencial dde identidade máxima	Identificação a partir do sequenciamento região $\beta$ tubulina e potencial dde identidade máxima
<i>Penicillium citrinum</i>	99% <i>Penicillium citrinum</i>	100% <i>Penicillium citrinum</i>
<i>P. citrinum</i>	99% <i>Penicillium herquei</i>	92% <i>Penicillium herquei</i>
<i>P.oxalicum</i>	99% <i>Penicillium herquei</i>	92% <i>Penicillium herquei</i>
<i>P.citrinum</i>	99% <i>Penicillium simplicissimum</i>	94% <i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>P.citrinum</i>	99% <i>Penicillium wotroi</i>	99% <i>Penicillium wotroi</i>
<i>P. citrinum.</i>	99% <i>Penicillium herquei</i>	92% <i>Penicillium herquei</i>
<i>P.lividum</i>	99% <i>Penicillium sclerotiorum</i>	98% <i>Penicillium sclerotiorum</i>
<i>P.expansum</i>	100% <i>Penicillium wotroi</i>	99% <i>Penicillium wotroi</i>
<i>P.decubens</i>	99 % <i>Penicillium singaporense</i>	94% <i>Penicillium singaporense</i>
<i>P.waksmai</i>	98% <i>Penicillium singaporense</i>	99% <i>Penicillium wotroi</i>
<i>P.expansum</i>	99% <i>Penicillium wotroi</i>	99% <i>Talaromyces pnophilus</i>
<i>P. pinophilus.</i>	100% <i>Penicillium veruculosus</i>	98% <i>Penicillium pnophilum</i>
<i>P.citrinum</i>	99% <i>Penicillium simplicissimum</i>	94% <i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>P.janthinellum</i>	99% <i>Penicillium wotroi</i>	92% <i>Penicillium brasilianum</i>
<i>P.simpliississimum</i>	99% <i>Penicillium herquei</i>	92% <i>Penicillium herquei</i>

## DISCUSSÃO

Os isolados selecionados apresentaram as características macroscópicas e microscópicas descritas por Pitt (1991) e Samson & Frisvad (2004). Segundo Nilsson et al. (2008) apontaram que 2% é uma margem aceitável para divergências intraespecíficas em Ascomycota para sequências da região ITS do rDNA e  $\beta$  tubulina, o que corrobora os resultados encontrados. Segundo Pitt (1991), o subgênero *Penicillium* é provavelmente o que apresenta maior dificuldade taxonômica, sobretudo pelo elevado número de espécies e pela semelhança morfológica entre as mesmas.

## CONCLUSÕES

O gênero *Penicillium* é complexo e por isso necessita de ferramentas que complementem sua identificação. A biologia molecular é uma eficiente ferramenta disponível para confirmação taxonômica;

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao doutorando Renan do Nascimento Barbosa pelo auxílio na realização da extração de DNA genômico, a mestrandia Juliana Cordoville Fonseca e a Roberta Cruz pelo auxílio nas demais etapas do projeto e ao CNPq pela bolsa de auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg & N., Larsson, K.H., 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*, 4, 193-201.

- Onions, A.H.S.; Brady, B.L. 1987. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Peberdy, J.F. (Ed.) *Biotechnology Handbooks 1 Penicillium and Acremonium*. New York and London, Plenum Press, 1-36.
- Pitt, J.I. 1991. A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing.
- Raper, K.B.; Thom, C. 1949. A manual of the Penicillia. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Samson, R.A., Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*?. *Medical Mycology* S1-S8.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. 2007a. Diagnostic tools to identify black aspergilla. *Studies in Mycology* 59: 129-145.
- Samson, R.A.; Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extralites. *Studies in Mycology* 49: 1-260.
- Varga, J., Kevei, F., Hamari, Z., Toth, B., Teren, J., Croft, J. H. & Kozakiewicz, Z. Genotypic and phenotypic variability among black Aspergilli. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus classification*, pp. 397–411. Edited by R. A. Samson & J. I. Pitt. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 2000.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315–322, in Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. 1990.