UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS *ZYGOMYCETES* COM INTERESSE EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

Vânia Patrícia Gonçalves Dantas

Orientação:

Prof.ª Doutora Maria do Rosário Martins

Prof. Doutor Nelson Lima

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

Universidade do Minho

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS *ZYGOMYCETES* COM INTERESSE EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

Vânia Patrícia Gonçalves Dantas

Orientação:

Prof.ª Doutora Maria do Rosário Martins

Prof. Doutor Nelson Lima

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Foram muitas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para o sucesso do mesmo e, assim sendo, deixo aqui o meu profundo e sincero agradecimento.

À Professora Maria do Rosário Martins pela orientação, ensinamentos, amizade e ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Nelson Lima pela orientação, ensinamentos, compreensão, simpatia, bem como por proporcionar a realização de parte do trabalho na Micoteca da Universidade do Minho.

À Doutora Célia Soares, pela paciência, apoio, dedicação e sobretudo amizade prestada, bem como a forma como me recebeu e me integrou no Departamento de Engenharia Biológica.

À Anabela Cabeça, do Departamento de Química da Universidade de Évora, que me acompanhou desde o início do trabalho e que me transmitiu todo o incentivo necessário para a continuação e finalização do mesmo, que me motivou ao máximo pela sua boa disposição e por toda a alegria e carinho transmitidos.

A todas as colegas de laboratório, mais especificamente a Andreia Piçarra, Carolina Rufino e Sílvia Arantes, que também contribuíram para a realização do trabalho, dando todos os apoios, tanto a nível do trabalho em si, como também a nível emocional, tornando os dias mais divertidos e descontraídos.

Aos meus amigos que me deram todo o apoio incondicional, força, incentivo, carinho e paciência nos momentos menos bons.

Por fim, à pessoa mais importante da vida, a minha mãe, à qual dedico todo este trabalho pela força e motivação que me transmitiu, bem como pelo esforço financeiro para assegurar a continuidade dos meus estudos.

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS *ZYGOMYCETES* COM INTERESSE EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

RESUMO

Neste trabalho desenvolveram-se estudos de identificação e classificação taxonómica de fungos *Mucorales*, dos géneros *Absidia*, *Circinella*, *Cunninghamella*, *Gongronella e Rhizopus*, com vista a correlacionar microrganismos do mesmo *taxa* e a construir um esquema de identificação polifásica com integração de dados morfológicos, proteómicos e genómicos. Procedeu-se à caracterização micro- e macro- morfológica das estirpes, estudos moleculares com amplificação de regiões satélite e estudos de identificação espetral por MALDI-TOF MS.

Os estudos morfológicos permitiram a caraterização das estirpes pela análise da cor, textura das colónias e das estruturas vegetativas e de reprodução assexuada. Os estudos moleculares de análise filogenética da região ITS permitiram o agrupamento das estirpes ao nível da espécie e possibilitaram a reclassificação taxonómica de algumas das estirpes em estudo. Os estudos de MALDI-TOF MS e de análise polimórfica por M13-PCR proporcionaram uma boa diferenciação das estirpes, corroborando os resultados da filogenia.

Palavras-chave: *Mucorales*, caracterização polifásica, ITS, sequenciação, MALDI-TOF MS, proteínas ribossomais

POLYPHASIC APPROACH OF *ZYGOMYCETES* FILAMENTOUS FUNGI WITH INTEREST IN ENVIRONMENTAL BIOTECHONOLOGY

ABSTRACT

This work comprises a set of identification and taxonomic classification studies of *Mucorales* fungi, genera *Absidia, Circinella, Cunninghamella, Gongronella* and *Rhizopus*, in order to correlate microorganisms from the same taxa and achieved a polyphasic approach, integrating morphological, proteomic and genomic results. Therefore, micro- and macro- morphological characterization of the strains, molecular studies with amplification of satellite regions and the spectral characterization studies by MALDI-TOF MS were carried out.

The morphological studies allowed the strain characterization, based on the color and texture of the colonies as well as their vegetative and reproductive structures. Phylogenetic analysis based on ITS region enabled grouping the strains at species level and allowed the taxonomic reclassification of some of the strains under study. Studies of MALDI-TOF MS analysis and polymorphic M13-PCR provided a good differentiation of the strains within the species, corroborating the results of phylogeny.

Key-words: *Mucorales*, polyphasic approach, ITS-sequencing, MALDI-TOF MS, ribosomal proteins

ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

AFLP – Polimorfismos de tamanho dos fragmentos amplificados, do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ATCC – Coleção Americana de Culturas tipo *American Type Culture Collection* (USA)

BS – *bootstrap*

CBS – Coleção de Culturas fúngicas tipo *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (Holanda)

CCMI – Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais (LNEG e INRB, Portugal)

DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DNTP – desoxirribonucleótidos trifosfatado, do inglês deoxynucleoside 5'- triphospahtes

EDTA – ácido etilenodiamina tetra-acético, do inglês ethylenediamine tetraacetic acid

FT-IR – espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier

ITS – espaçador transcrito interno, do inglês *Internal Transcribed Spacer*

IV – infravermelho

LSU – subunidade maior do RNA ribossómico, do inglês *large subunit*

MALDI-TOF MS - espetrometria de massa com analisador de tempo voo e ionização/desorção a laser assistida por matriz

MEA – meio extrato de malte e agar

m/z – razão massa carga

MUM – Micoteca da Universidade do Minho

pb – par de bases

PCR – reação de polimerase em cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PDA – meio de dextrose, batata e agar

RAPD – polimorfismo de DNA amplificado de modo aleatório, do inglês *Random Amplification of Polymorphic DNA*

RFLP – polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA – ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*

RNase – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

SEM – microscopia eletrónica de varrimento, do inglês *Scanning Electron Microscope*

SSU – subunidade menor do RNA ribossómico, do inglês *small subunit*

TBE – Tris-Borato-EDTA

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

UV – ultravioleta

UNIDADES E SISTEMAS DE MEDIDA

kDa; Da – kilodalton; dalton

kV; V – kilovolt; volt

M; mM; µM – molar; milimolar; micromolar

min; ns – minuto; nanosegundo

L; mL; µL – litro; mililitro; microlitro

mm; nm – milímetro; nanómetro

µg – micrograma

°C – graus Celsius

ÍNDIC GERAL

AGRADECIMENTOS i
RESUMO ii
ABSTRACT iii
ABREVIATURAS E CONVENÇÕES iv
UNIDADES E SISTEMAS DE MEDIDA vi
ÍNDICE GERAL vii
ÍNDICE DE FIGURAS ix
ÍNDICE DE TABELAS xi
1. PROBLEMÁTICA 1
2. OBJETIVOS 3
2.1. Objetivo Geral 3
2.2. Objetivos específicos 3
3. FUNDAMENTO TEÓRICO 4
3.1. Mucorales 4
3.2. Identificação polifásica 7
3.2.1. Identificação fenotípica 9
3.2.1.1. Morfologia 9
3.2.1.2. Fisiologia 10
3.2.1.3. MALDI-TOF MS 10
3.2.1.4. FT-IR 12
3.2.2. Caracterização Molecular 13
3.2.2.1. ITS 13
3.2.2.2. Diversidade molecular (RAPD e M13-PCR) 15
4. MATERIAIS E MÉTODOS 17
4.1. Seleção dos microrganismos 17
4.2. Manutenção dos organismos 17
4.2.1. Armazenamento de curta duração 17
4.2.2. Armazenamento de longa duração 17
4.3. Identificação fenotípica 19
4.3.1. Análise morfológica 19
4.3.1.1. Macroscopia 19
4.3.1.2. Microscopia 19

4.3.2. MALDI-TOF MS 19
4.4. Caracterização molecular 20
4.4.1. Extração do DNA genómico 20
4.4.2. Quantificação do DNA por espectrometria 21
4.4.3. M13-PCR 21
4.4.4. **Amplificação e sequenciação da região ITS** 22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
5.1. Quantificação do DNA genómico 26
5.2. Análise morfológica 26
5.3. Filogenia 35
5.4. M13-PCR e *fingerprinting* 40
5.5. MALDI-TOF MS 45
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS 49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50
8. ANEXOS 55
Anexo I: Soluções e Meios de Cultura 55
Anexo II 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas reprodutivas de dois géneros de fungos pertencentes à ordem *Mucorales* 6

Figura 2 - Caracterização polifásica para a identificação de fungos filamentosos de acordo com Simões et. al (2013a). 8

Figura 3 - Representação esquemática do espaçador transcrito interno (ITS), a unidade repetitiva ribossomal nuclear utilizada para descrever os fungos ao nível da espécie e a posição relativa dos primers (Adaptado de Bellemain, 2010). 14

Figura 4 – Aspeto macroscópico das colónias de *Gongronella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso. 27

Figura 5 – Aspeto macroscópico das colónias de *Gongronella* spp. e *Circinella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso. 28

Figura 6 – Aspeto macroscópico das colónias de *Circinella* spp. e *Absidia* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso. 29

Figura 7 – Aspeto macroscópico das colónias de *Rhizopus* spp. e *Cunninghamella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso. 30

Figura 8 - Estruturas reprodutoras de *Gongronella* spp. e *Circinella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. 32

Figura 9 - Estruturas reprodutoras de *Absidia* spp., *Cunninghamella* spp. *Circinella* spp. e *Rhizopus* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. 33

Figura 10 - Eletroforese dos produtos de PCR da região ITS das estirpes de *Gongronella* spp. 35

Figura 11 - Eletroforese dos produtos de PCR da região ITS das estirpes de *Gongronella* spp., *Absidia* spp. e *Cunninghamella* spp 36

Figura 12 - Eletroforese dos produtos de PCR da região ITS das estirpes de *Rhizopus* spp 36

Figura 13- Árvore filogenética construída com base nas sequências da região ITS, utilizando o método de Neighbor-Joining com um valor de bootstrap 1000. 38

Figura 14 - Eletroforetograma obtido após M13-PCR para as estirpes de *Gongronella* spp. 40

Figura 15 - Eletroforetograma obtido após M13-PCR para as estirpes de *Absidia* spp., *Cunninghamella* spp. e *Rhizopus* spp. 41

Figura 16 - Dendograma do perfil de eletroforese obtido apos M13-PCR para as estirpes de *Gongronella* spp. 42
Figura 17 - Dendograma do perfil de eletroforese obtido apos M13-PCR para as estirpes de *Absidia* spp., *Cunninghamella* spp. e *Rhizopus* spp. 44
Figura 18 – Espectros de massa representativos de estirpes do género *Gongronella*… 46
Figura 19 -Dendograma resultante da análise por MALDI-TOF MS dos 30 isolados em estudo..... 47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação das diferentes classificações do filo *Zygomycota* (Adaptado de Liu & Voigt, 2009). 4

Tabela 2 - Resumo da estrutura das famílias pertencentes à ordem *Mucorales* baseada na morfologia (Benny et al., 2001), bem como na caraterização molecular (Voigt & Wöstemeyer, 2001). 5

Tabela 3 – Descrição das estirpes fúngicas em estudo. 18

Tabela 4 - Descrição das estirpes e número de acesso GenBank. 25

Tabela 5 – Quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA das estirpes em estudo. 57

1. PROBLEMÁTICA

O estudo apresentado neste projeto está inserido no âmbito dos estudos desenvolvidos na Micoteca da Universidade do Minho em colaboração com a Professora Rosário Martins do Departamento de Química da Universidade de Évora, tendo em vista a caracterização de alguns fungos do grupo *Zygomycetes* presentes nesta coleção de culturas.

Neste estudo pretendeu-se caracterizar as estirpes *Gongronella* sp. CCMI 1101 e *Rhizopus stolonifer* CCMI 1105, isoladas de um solo com cultura de vinha no Alentejo e as estirpes obtidas após enriquecimento seletivo com pesticida, *Gongronella* sp. CCMI 1100 e *Rhizopus stolonifer* CCMI 1104, que apresentaram capacidade para degradar o metalaxil, fungicida utilizado no combate do míldio na videira. Para o efeito, foram selecionadas varias estirpes de *Zygomycetes* dos géneros *Gongronella, Rhizopus, Absidia, Circinella e Cunninghamella.*

A Micoteca da Universidade do Minho foi a primeira Coleção de Fungos Certificada no normativo ISO9001:2008 em Portugal, inserida na Rede Europeia de Recursos Microbiológicos, sendo atualmente, o seu Diretor, o Professor Nelson Lima, co-orientador deste trabalho. Esta coleção de culturas tem como principal objetivo, manter e fornecer estirpes com qualidade e autenticidade para a investigação em biotecnologia e ciências da vida.

A identificação dos fungos filamentosos tem constituído um desafio para a uniformização dos critérios de classificação, dada a sua diversidade morfológica, dependente das diferentes condições ambientais e as diferenças observadas nas classificações com base nas estruturas reprodutoras e nos estudos de filogenia. Assim, uma correta identificação destes organismos eucariotas passa por uma identificação polifásica, que tenha em conta a identificação fenotípica e genotípica.

A abordagem fenotípica, para além da caracterização morfológica, com a observação macroscópica e microscópica das estirpes e das suas estruturas reprodutoras, deve incluir uma análise espectral das colónias por MALDI-TOF MS e/ou FT-IR.

A abordagem genotípica inclui a sequenciação de regiões conservadas, designadas por regiões satélite, nomeadamente a região ITS (considerada como universal, tendo sido designada por "código de barras" para a identificação filogenética dos fungos

filamentosos, apesar de muitas vezes se apresentar inespecífica), das regiões SSU e LSU, bem como de genes codificadores de proteínas, como por exemplo, β-tubulina, calmodulina, actina, fator de elongamento 1α…

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificação polifásica de fungos *Mucorales* para identificação e classificação taxonómica dos géneros *Absidia, Circinella, Cunninghamella, Gongronella e Rhizopus.*

2.2. Objetivos específicos

- Estudar as condições de crescimento de estirpes fúngicas dos géneros *Absidia*, *Circinella, Gongronella, Cunninghamella* e *Rhizopus* em meios de cultura adequados;

- Avaliar as características morfológicas, macroscópicas (aspeto, diâmetro das colónias, coloração do micélio, etc) e microscópicas (hifas, estruturas reprodutoras, esporos, etc);

- Identificar os perfis dos isolados fúngicos por MALDI-TOF MS e construir espectros de referência;

- Identificar geneticamente as diferentes estirpes por sequenciação das regiões ITS e comparar os diferentes perfis de genotipagem por amplificação M13-PCR;

- Construir um esquema de identificação fúngica baseada na abordagem polifásica com a integração dos dados morfológicos, proteómicos e genómicos.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1. Mucorales

As abordagens tradicionais usadas para classificar os fungos, como os registros fósseis, a bioquímica e especialmente, a morfologia tornaram-se menos relevantes quando apareceu a sistemática molecular (White et al., 1990).

Na mais recente classificação do reino Fungi, tendo em conta vários estudos filogenéticos, o filo *Zygomycota* foi temporariamente rejeitado e os taxa que anteriormente o constituíam, foram distribuídos em cinco grupos, incluindo o filo *Glomeromycota* e quatro subfilos (*incertae sedis*), nomeadamente *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Mucoromycotina e Zoopagomycotina*, como apresentado na Tabela 1 (Hibbett et al., 2007).

Tabela 1 – Comparação das diferentes classificações do filo *Zygomycota* (Adaptado de Liu & Voigt, 2009).

Hawksworth et al. (1995)	**Kirk et al. (2001)**	**Hibbett et al. (2007)**
ZYGOMYCOTA	*ZYGOMYCOTA*	*GLOMEROMYCOTA*
Zygomycetes	*Zygomycetes*	*Glomeromycetes*
	1. Geosiphonales	
1. Glomales	*2. Glomales*	*1. Glomerales*
		SUBPHYLA INCERTAE SEDIS
		Entomophthoromycotina
2. Entomophthorales	*3. Entomophthorales*	*1. Entomophthorales*
Basidiobolaceae	*4. Basidiobolales*	
		Mucoromycotina
3. Endogonales	*5. Endogonales*	*1. Endogonales*
Mortierellaceae	*6. Mortierellaceae*	*2. Mortierellaceae*
4. Mucorales	*7. Mucorales*	*3. Mucorales*
		Zoopagomycotina
5. Zoopagales	*8. Zoopagales*	*1. Zoopagales*
		Kickxellomycotina
6. Dimargaritales	*9. Dimargaritales*	*1. Dimargaritales*
7. Kickxellales	*10. Kickxellales*	*2. Kickxellales*
Trichomycetes	*Trichomycetes*	
1. Asellariales	*1. Asellariales*	*3. Asellariales*
2. Harpellales	*2. Harpellales*	*4. Harpellales*
3. Amoebidiales		
4. Eccrinales	*3. Eccrinales*	

Dentro do subfilo *Mucoromycotina*, encontram-se entre outras, a ordem *Mucorales*, na qual se englobam os fungos em estudo na presente dissertação.

A estrutura das famílias pertencentes à ordem *Mucorales* ainda é bastante instável, mas com a descoberta de novos caracteres moleculares potencialmente informativos a nível da filogenia e com a disponibilidade de microscopia de resolução elevada (por exemplo, fluorescência, SEM) tornou-se viável para revelar ramos monofiléticos (Hoffman et al., 2013).

A classificação amplamente aceite, predominantemente baseada em características morfológicas em combinação com estudos moleculares, encontra-se resumida na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo da estrutura das famílias pertencentes à ordem *Mucorales* baseada na morfologia (Benny et al., 2001), bem como na caraterização molecular (Voigt & Wöstemeyer, 2001).

Família	**Género**
Chaetocladiaceae	*Chaetocladium*, *Dichotomocladium*
Choanephoraceae	*Blakeslea*, *Choanephora*, *Poitrasia*
Cunninghamellaceae	*Cunninghamella*
Mortierellaceae	*Aquamortierella*, *Dissophora*, *Echinosporangium*, *Modicella*, *Mortierella*, *Umbelopsis*
Mucoraceae	*Absidia*, *Actinomucor*, *Apophysomyces*, *Chlamydoabsidia*, *Circinella*, *Circinomucor*, *Dicranophora*, *Gongronella*, *Halteromyces*, *Hyphomucor*, *Micromucor*, *Mucor*, *Mycocladus*, *Parasitella*, *Protomycocladus*, *Rhizomucor*, *Rhizopodopsis*, *Rhizopus*, *Spinellus*, *Sporodiniella*, *Syzygites*, *Thermomucor*, *Zygorhynchus*
Mycotyphaceae	*Benjaminiella*, *Mycotypha*
Phycomycetaceae	*Phycomyces*
Pilobolaceae	*Pilaira*, *Pilobolus*, *Utharomyces*
Radiomycetaceae	*Hesseltinella*, *Radiomyces*
Saksenaeaceae	*Saksenaea*
Syncephalstraceae	*Syncephalastrum*
Thamnidiaceae	*Backusella*, *Cokeromyces*, *Ellisomyces*, *Fennellomyces*, *Helicostylum*, *Kirkomyces*, *Phascolomyces*, *Pirella*, *Thamnidium*, *Thamnostylum*, *Zychaea*

Walther et al. (2013), com base em estudos filogenéticos por sequenciação de regiões satélites (genes actina, fator de elongamento 1α, SSU e LSU) propuseram a

atualização da Tabela 2, na qual por exemplo, os géneros *Absidia* e *Gongronella* pertencem à família *Cunninghamellaceae* e o género *Rhizopus* à família *Rhizopodaceae*.

Os fungos da ordem *Mucorales* são ubíquos, predominantemente saprófitas, mas também parasitas de plantas, fungos e animais. São geralmente caracterizados pelo abundante micélio não septado e de rápido crescimento, bem como pelas estruturas anamórficas geralmente formadas em grandes quantidades. Os esporangiósporos são produzidos em mesoesporângios ou esporângios multi-esporulados, sendo estes últimos, caracterizados pela inclusão de uma columela de forma e tamanho variado, como apresentado na Figura 1 (Hoffman et al., 2013).

No entanto, também se reproduzem sexualmente através de zigósporos após fusão de dois gametângios formados no ápice de hifas sob a influência de substâncias voláteis (derivados do β-caroteno) que proporcionam a atração de hifas compatíveis, e reprodução assexual por meio de esporos formados num esporângio, estrutura grande e globosa cuja parede rebenta para libertar os esporos (Hoffman et al., 2013).

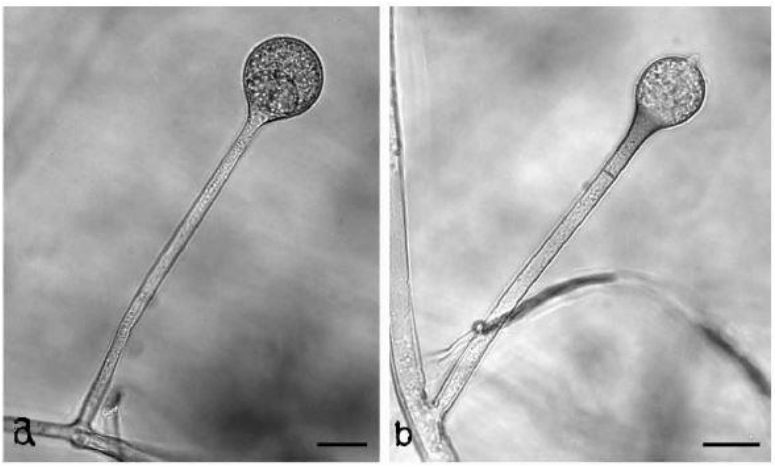

Figura 1 - Estruturas reprodutivas de dois géneros de fungos pertencentes à ordem *Mucorales*
a. *Gongronella* sp.; b. *Absidia* sp. (Adaptado de Hoffman et al., 2013).

Dadas as suas propriedades estruturais e fisiológicas, os fungos da ordem *Mucorales* estão a receber múltiplas aplicações em biotecnologia. São utilizados para diversas transformações biológicas, bem como a produção de aditivos para alimentos, rações, medicamentos (como o licopeno) ou várias aplicações do quitosano, um componente da parede celular, conhecido por ser produzido apenas por estes (Gladkowski et al., 2004).

No entanto, também são agentes deterioradores em cereais armazenados e outros alimentos, especialmente frutas e legumes. Além disso, alguns organismos também infetam as plantas vivas, especialmente as frutas (morango ou feijão verde), sendo considerados, importantes agentes fitopatogénicos (Pitt & Hocking, 2009).

Por outro lado, alguns destes fungos são patogénicos para o Homem, pelo que nas últimas décadas, tem sido referidas várias infeções causadas por *Mucorales* (designadas de mucormicoses) as quais poderão ser críticas em doentes com deficiência imunológica ou metabólica grave. Uma terapia rápida, adequada e eficaz, é necessária, uma vez que estas infeções podem resultar na morte em apenas alguns dias. O aumento da suscetibilidade dos fungos a fungicidas comercializados indicam uma necessidade premente para uma terapia eficaz (Skiada et al., 2011).

3.2. Identificação polifásica

Os dados relativos a cada estirpe fúngica, como as descrições morfológicas e moleculares, incluindo os dados espectrais (espectrometria de massa com analisador de tempo voo e ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)), as propriedades fisiológicas e bioquímicas, os papéis ecológicos e riscos ou benefícios sociais, são elementos importantes para a identificação dos fungos. A fim de alcançar uma boa identificação do fungo é necessária uma abordagem polifásica (Figura 2), na qual se deverá efetuar a integração de dados morfológicos, bioquímicos, genómicos e proteómicos (Simões et al., 2013a).

Os dados provenientes de uma abordagem polifásica permitem obter facilmente uma identificação e autenticação robusta, a fim de estruturar coleções de culturas confiáveis e gerar dados úteis precisos e de qualidade (Keys et al., 2004).

Figura 2 - Identificação polifásica para a identificação de fungos filamentosos de acordo com Simões et. al 2013a.

No entanto, para a correta identificação das espécies é necessário combinar mais abordagens fenotípicas e fisiológicas tradicionais com a biologia molecular moderna. O polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP), o polimorfismo de DNA amplificado de modo aleatório (RAPD) e o polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), têm sido utilizados para distinguir o taxa microbiana difícil de caracterizar por meios morfológicos tradicionais (Rodrigues et al., 2011).

Recentemente, a consistente identificação de espécies de fungos filamentosos foi desenvolvida pela aplicação da chamada abordagem polifásica. Esta consiste no uso de diferentes técnicas apoiadas na sistematização do conhecimento científico. Diferentes metodologias como micro- e macro- morfologia, análises bioquímicas e de biologia molecular são aplicadas (Dias et al., 2011).

A análise espectral microbiana baseada em espectrometria de massa pela técnica de MALDI-TOF MS, tem sido desenvolvida e usada como um importante passo para a identificação polifásica de fungos filamentosos em diferentes domínios. A primeira abordagem comumente utilizada neste processo é a caracterização morfológica seguido pela análise bioquímica, espectral e da biologia molecular. Devido a custos mais elevados e maior tempo de resposta, quando comparados com MALDI-TOF MS, a biologia molecular é normalmente utilizada como última metodologia. De acordo com Santos & Lima (2010) a biologia molecular tem sido reconhecida como a técnica padrão na

metodologia moderna polifásica de identificação de fungos filamentosos (Simões et al., 2013a).

3.2.1. Identificação fenotípica

3.2.1.1. Morfologia

A análise das características morfológicas é extremamente importante, tanto para a identificação como caracterização de fungos. Quando se lida com inúmeras espécies de um género, é necessário dividi-las em grupos com base nas suas características (Simões et al., 2013b).

A morfologia macroscópica é efetuada com base nas características das colónias, designadamente, cor do micélio e dos esporos, textura, cor do reverso das colónias, produção de metabolitos corados, diâmetro das colónias em períodos de crescimento padronizados. Estas caraterísticas devem ser efetuadas em condições normalizadas, uma vez que são dependentes de fatores ambientais, como a composição do meio de cultura e temperatura de incubação, entre outros (Rodrigues et al., 2009).

A morfologia microscópica é definida pelas características do micélio e das estruturas de reprodução, observadas por meio de técnicas de microscopia, que incluem: o tamanho e forma da vesícula ou columela; o tamanho e forma dos conídios e esporangiósporos; o aspeto do micélio, septado ou cenocítico; a textura dos zigósporos, entre outros (Klich, 2002).

O método padrão para a identificação e classificação de fungos filamentosos permanece baseado na caracterização morfológica porque, em geral, estes apresentam características morfológicas mais distintivas do que, por exemplo, organismos unicelulares tais como bactérias e leveduras (Santos & Lima, 2010).

3.2.1.2. Fisiologia

A incorporação de características bioquímicas (por exemplo, enzimas e metabolitos secundários) na taxonomia dos fungos tem ajudado a resolver limitações morfológicas (Petisco et al., 2008).

Diferentes classes de enzimas têm sido usadas como importantes características bioquímicas para a caracterização de fungos. Geralmente os fungos podem viver sob condições limitadas, porque são capazes de produzir um conjunto de metabolitos secundários, designadamente, enzimas como lenhina peroxidases, manganês peroxidases, lacases, proteases, celulases, pectinases, xilanases, esterases e lipases capazes de converter madeira, plástico, tintas, entre outros substratos, em nutrientes úteis. Estes enzimas são uma das características utilizadas para o desenvolvimento do perfil bioquímico fúngico (Martins et al., 2003).

Os fungos filamentosos, em geral, são capazes de produzir uma grande variedade de metabolitos secundários. Estes metabolitos são produtos naturais e alguns são mesmo vitais para o fungo produtor; como seja a produção de melaninas que protegem contra a irradiação solar ou outros agentes agressores. Apesar de serem produzidos pela maior parte de fungos filamentosos, apenas um número restrito de espécies produz metabolitos secundários com propriedades tóxicas, a que se dá o nome de micotoxinas (Santos et al., 1998).

A maioria das micotoxinas são produzidas pelos géneros *Aspergillus, Fusarium* e *Penicillium*, não tendo sido ainda relatado a presença destas em géneros da ordem *Mucorales* (Abramson et al., 2009).

3.2.1.3. MALDI-TOF MS

A espetrometria de massa está disponível desde há 50 anos para a análise das massas moleculares dos compostos. No entanto, esta técnica quando aplicada a grandes biomoléculas tem apresentado limitações devido à baixa volatilidade e inerente instabilidade térmica. Tais problemas foram ultrapassados com o desenvolvimento de uma técnica denominada de MALDI-TOF MS (espetrometria de massa com analisador de tempo voo e ionização/desorção a laser assistida por matriz). Esta técnica surgiu no

final de 1980, na investigação de compostos orgânicos de alta massa molecular (Santos et al., 2010).

Hoje em dia, esta técnica pode ser aplicada a compostos com uma vasta gama de massas moleculares, tendo sido utilizada na identificação de cianobactérias tóxicas e não tóxicas pela análise de metabolitos secundários de baixa massa molecular (Erhard et al., 1997).

Esta técnica demarca-se pelo grande potencial em diagnósticos na medicina humana ou veterinária, na fitopatologia e botânica experimental, na monitorização da contaminação ambiental, e na biotecnologia microbiana (Kallow et al., 2006).

Esta metodologia mostrou também ser uma abordagem fiável para a resolução de alguns problemas clínicos, bem como na microbiologia alimentar, tais como na identificação rápida e precisa e diferenciação de estirpes, superando as limitações existentes de métodos de cultura clássicos (Sedo et al., 2011).

Recentemente, a técnica também tem sido utilizada como uma ferramenta de diagnóstico para a identificação de espécies de bactérias e fungos. Estudos recentes, realizados com centenas de estirpes, confirmaram a eficiência do MALDI-TOF MS como uma ferramenta para a identificação de espécies dentro de géneros de fungos clinicamente importantes, incluindo *Aspergillus, Fusarium e Penicillium*, dermatófitos e taxa da ordem *Mucorales* (Abreu et al., 2014).

A técnica de MALDI-TOF MS consiste em submeter uma amostra coberta com uma matriz de absorção de UV que funciona como um mediador de energia, a um laser pulsado de azoto (337 nm). A matriz absorve os raios UV e converte-os em energia térmica, sendo assim a amostra vaporizada. São formados iões de vários tamanhos, que de acordo com a razão massa/carga vão atingir o detetor a diferentes tempos (Rodrigues et al., 2011).

Existem várias matrizes disponíveis, sendo crucial a escolha da mais apropriada para a identificação de microrganismos. Atualmente, as duas matrizes mais utilizados para a identificação de fungos filamentosos são o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) e ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). Ambas são apropriadas para a análise de moléculas com uma gama de massas entre 2 e 20 kDa (Dias et al., 2011).

A função das matrizes contendo porções aromáticas é a diluição da amostra e a absorção da energia do laser proporcionando assim uma ionização "suave" da amostra. A utilização de uma matriz inadequada irá diminuir a ionização suave, conduzindo a uma forte fragmentação das proteínas analisadas. O objetivo é a utilização de uma matriz apropriada que conduza a uma relação sinal/ruído ótima com pouca supressão do sinal e, por conseguinte, os melhores resultados analíticos (Santos et al., 2010).

Os espectros gerados pela análise de extratos celulares brutos, ou mesmo células inteiras, funcionam como "impressões digitais" únicas de cada microrganismo e a identificação destes é baseada nos perfis de proteínas obtidas e posterior comparação com um banco de dados previamente existentes (Abreu et al., 2014).

Os bancos de dados permitem comparar proteínas desconhecidas com massas moleculares de referência. As proteínas ribossomais são normalmente as mais utilizadas como massas moleculares de referência, visto serem as mais abundantes nas células. A calibração externa do MALDI-TOF MS é realizada usando proteínas bem caracterizadas a partir de *Escherichia coli*. De dezenas de proteínas ribossomais de células intatas de *E. coli*, apenas 12 proteínas bem definidas são usadas como padrão (4,365.4, 5,096.8, 5,381.4, 6,241.4, 6,255.4, 6,316.2, 6,411.6, 6,856.1, 7,158.8, 7,274.5, 7,872.1, 9742 e 12,227.3 Da) (Simões et al., 2013a).

As vantagens desta abordagem como método de identificação, caracterização e autenticação microbiana, são o simples procedimento de preparação da amostra, o curto tempo de análise (alguns minutos), o elevado número de amostras que podem ser analisadas, a fiabilidade dos dados e o facto de ser uma técnica de baixo custo (Simões et al., 2013a).

3.2.1.4. FT-IR

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica antiga e poderosa de caracterização da composição química de microrganismos. Tem sido aplicada com sucesso em vários campos de controlo de qualidade bem como na identificação de fungos filamentosos e leveduras (Fischer et al., 2006).

É uma técnica rápida, eficaz e livre de reagentes, aplicável a todos os microrganismos e onde se requer uma pequena quantidade de biomassa (Essendoubi et al., 2007).

Os espectros de IV são altamente específicos para cada estirpe e espécie, representando a composição química total das células, tais como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e os polissacáridos (Lee & Chapman, 1986).

As vantagens do FT-IR como método de autenticação microbiana são: o simples procedimento de preparação de amostras, um curto período de tempo de análise e a fiabilidade dos dados, permitindo obter uma base de dados dos espectros de referência necessária para uma correta caracterização microbiana. O sucesso desta metodologia para identificação dos microrganismos está dependente da complexidade da base de dados dos espectros de referência (Kummerle et al., 1998).

O procedimento de preparação das amostras deve ser otimizado para atingir um elevado nível de reprodutibilidade dos espectros, para evitar erros de identificação (Santos et al., 2010).

3.2.2. Caracterização Molecular

3.2.2.1. ITS

Os avanços das ferramentas moleculares, em particular o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) formaram a base para um impulso em estudos sobre a diversidade de fungos e permitiu uma abordagem muito mais simples e sensata para o estudo dos fungos. Com a informação de dados moleculares é possível um melhor entendimento das relações de fungos e um processo de classificação mais natural (Branco, 2011).

Com a ajuda de ferramentas de bioinformática, novos bancos de dados genéticos estão a ser criados e utilizados como fontes de códigos de barras moleculares. O DNA *barcoding* é uma técnica de caracterização de organismos ao nível da espécie utilizando

uma curta sequência de DNA entre os 500 e 800 pares de bases de uma determinada posição no genoma (Schoch et al., 2012).

A fração mitocondrial do gene citocromo c oxidase I (COX1) tornou-se o primeiro DNA *barcoding* oficial para os animais e para as plantas. No entanto, uma vez que algumas espécies de fungos possuem genótipos distintos neste locus, nenhum fragmento consenso de DNA foi definido para fungos. Portanto, torna-se importante identificar genes que caracterizam organismos fúngicos em diferentes níveis taxonómicos de uma forma simples e padronizada (Hebert et al., 2003).

Os marcadores mais estudados são um ou mais dos genes nucleares do RNA ribossomal, por exemplo, o gene 18 S da subunidade pequena ribossomal (SSU), a região do espaçador transcrito interno (ITS), que inclui o gene 5.8S, e o gene 28 S da subunidade grande ribossomal (LSU), como representado na Figura 3 (Bellemain et al., 2010).

O grande número de cópias ITS por célula (até 250), e por ser uma região fortemente conservada mas com alta variabilidade, torna o ITS um alvo atraente para sequenciação sempre que a quantidade e qualidade de DNA presente é baixa (Nilsson et al., 2009).

Vários *primers* são utilizados para amplificar partes ou mesmo a totalidade da região ITS (White et al., 1990).

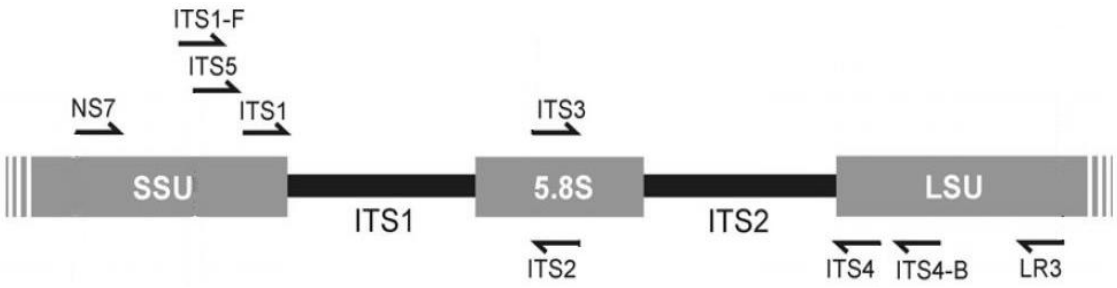

Figura 3 - Representação esquemática do espaçador transcrito interno (ITS), a unidade repetitiva ribossomal nuclear utilizada para descrever os fungos ao nível da espécie e a posição relativa dos *primers* (Adaptado de Bellemain, 2010).

No entanto, a escolha e utilização da região ITS também apresenta desvantagens, uma vez que a capacidade de discriminar a nível da espécie difere consideravelmente

entre os grupos de fungos e, em alguns casos, a identificação ao nível de espécie pode ser ambígua (Soares et al., 2012).

Por esta razão, os genes codificadores de proteínas como a calmodulina, a β-tubulina, a actina e o fator de elongamento 1α têm sido utilizados em análises filogenéticas de importantes fungos deterioradores dos alimentos (Hoffmann et al., 2013).

A análise de sequências *multilocus* de DNA pode assim, evitar a subjetividade na determinação de espécies através do uso de análise de concordância de vários genes, fornecendo informações confiáveis para a identificação de espécies de fungos (Soares et al., 2012).

3.2.2.2. Diversidade molecular (RAPD e M13-PCR)

As tecnologias de análise molecular de variabilidade do DNA permitem determinar zonas de referência no genomas, denominadas marcadores moleculares. A utilização de marcadores moleculares para a diferenciação das espécies permite abordagens alternativas à caracterização morfológicas das espécies fúngicas (Williams et al., 1990).

Entre as técnicas mais simples de análise da variabilidade genética e que não exigem um conhecimento detalhado do genoma, distinguir-se a análise de polimorfismos em produtos de amplificação por PCR, denominada por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Esta técnica baseia-se na amplificação aleatória por PCR de sequências desconhecidas de DNA utilizando *primers* de pequenas dimensões (10-15 pb) de sequências arbitrárias (Kumar & Gurusubraman, 2011).

Um dos *primers* mais utilizado foi isolado do bacteriófago M13, apresentando uma sequência que já foi detetada em múltiplas cópias espalhadas no genoma humano, e ao ser aplicado a outros eucariotas, com por exemplo aos fungos unicelulares e filamentosos, demonstrou ter um elevado poder de diferenciação ao nível da espécie. Vários autores já salientaram o elevado poder identificativo e reprodutibilidade desta técnica relativamente à utilização de *primers* aleatórios de RAPD, porque permite obter perfis muito homogéneos para a mesma espécie e completamente diferentes em espécies distintas. Sendo assim é possível, obtém-se uma "impressão digital" (*fingerprinting*) para cada espécie refletindo o polimorfismo existente nas regiões de DNA repetido e a distancia que as separa entre si (Martin et al., 1998).

Atualmente, o polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) tem sido também referido como uma escolha para caracterizar a diversidade genética de muitas espécies. Esta tecnologia associa a amplificação de regiões específicas, como por exemplo a região ITS, seguida da aplicação de enzimas de restrição, permitindo obter um polimorfismo capaz de diferenciar as espécies em estudo. No entanto, este estudo implica muitas vezes a aplicação de várias enzimas de restrição de modo a ser possível detetar esse polimorfismo, sendo um processo demorado, trabalhoso e dispendioso (Bardakci, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção dos microrganismos

No presente trabalho selecionaram-se estirpes fúngicas de *Gongronella* sp. CCMI 1101 e CCMI 1100 e *Rhizopus* sp. CCMI 1105 e CCMI 1104 isoladas de solos vitícolas, com capacidade de degradação do metalaxil (Martins et al., 2013), depositadas nas coleções de culturas CCMI (*Culture Collection of Industrial Microorganisms*) e MUM (Micoteca da Universidade do Minho), estirpes de *Gongronella* da coleção de culturas ATCC (*American Type Culture Collection*) e várias estirpes de *Mucorales* da coleção de culturas CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures)*. A descrição das estirpes estudadas é apresentada na Tabela 3.

4.2. Manutenção dos organismos

4.2.1. Armazenamento de curta duração

As estirpes fúngicas isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio *Potato Dextrose Agar* e meio *Malt Extract Agar* inclinado e, após incubação a 25°C durante 7 dias, foram conservadas à temperatura de 4°C, sendo efetuadas repicagens periódicas de 2 em 2 meses.

4.2.2. Armazenamento de longa duração

As estirpes fúngicas isoladas foram também conservadas pelo método da congelação em pérolas de vidro a -80°C. As culturas microbianas crescidas em rampas com 7 dias foram ressuspendidas em 5 mL de glicerol a 5% (p/v), utilizado como crioprotector. Após homogeneização, colocou-se 1 mL de suspensão de cada cultura em tubos de rosca de 2 mL contendo esferas de vidro (ϕ médio de 2 mm), previamente esterilizadas por calor húmido em autoclave. Os tubos foram homogeneizados de forma a envolver todas as esferas de vidro com a suspensão microbiana, o excesso de suspensão foi retirado e os tubos foram colocados a -80°C numa utra-congeladora.

Tabela 3 – Descrição das estirpes fúngicas em estudo.

Nº da estirpe	**Espécie**	***Status***	**Fonte**
CBS 125.68	*Absidia anomala*	T	solo (Cuba)
CBS 100.28	*Absidia blakesleeana*	T	n.d.
CBS 104.08	*Absidia coerulae*	T	solo (n.d)
CBS 101.59	*Absidia cuneospora*	T	solo (EUA)
CBS 101.08	*Absidia glauca*	T	n.d.
CCMI 91	*Absidia glauca*		n.d. (Portugal)
CBS 174.67	*Absidia parricida*	NT	n.d.
CBS 101757	*Circinella lacrimispora*		solo (Argentina)
CCMI 24	*Circinella simplex*		n.d. (Portugal)
CBS 156.28	*Cunninghamella echinulata*	NT	n.d.
CBS 481.66	*Cunninghamella elegans*		solo (Brasil)
ATCC 8989	*Gongronella butleri*		solo (Wisconsin)
CBS 157.25	*Gongronella butleri*	T	raíz de *Cocos nucífera (Indonésia*
CBS 216.58	*Gongronella butleri*	T	solo (Inglaterra)
CBS 179.28	*Gongronella butleri*		n.d.
CBS 227.36	*Gongronella butleri*		n.d.
CBS 228.36	*Gongronella butleri*		n.d.
CBS 194.60	*Gongronella butleri*		n.d.
CBS 259.52	*Gongronella butleri*		solo (Itália)
CBS 102.44	*Gongronella butleri*		n.d. (Itália)
CBS 610.94	*Gongronella butleri*		solo (Argentina)
CBS 969.73	*Gongronella butleri*		solo (Chile)
ATCC 244.12	*Gongronella lacrispora*	T	solo (Maryland)
CBS 244.62	*Gongronella lacrispora*	T	Solo (EUA)
CCMI 1101	*Gongronella* sp. 1		solo (Portugal)
CCMI 1100	*Gongronella* sp. 2		solo (Portugal)*
CCMI 900	*Rhizopus oryzae*		n.d. (Portugal)
CCMI 1105	*Rhizopus stolonifer*		solo (Portugal)
CCMI 1104	*Rhizopus stolonifer*		solo (Portugal)*
CBS 403.51	*Rhizopus stolonifer*		n.d. (China)

*T- estirpes tipo; NT- estirpes neótipo; n.d.-não definido; *enriquecidas em meio seletivo contendo fungicida. Os dados das estirpes de CBS foram obtidos através da base de dados da CBS e da bibliografia (Walther et al., 2013).*

Paralelamente, procedeu-se também à conservação das estirpes fúngicas pelo método descrito por Castellani (Castellani, 1967; Simões et al., 2013a). As colónias fúngicas crescidas em placas durante 7 dias foram cortadas em forma de discos e transferidos para microtubos de 2 mL estéreis e cobertos com água destilada estéril. Os microtubos foram posteriormente armazenados à temperatura ambiente. Para a recuperação das estirpes, os discos foram removidos assepticamente e transferidos para

meio de agar fresco, colocando-os com o micélio voltado para o meio para recuperar as culturas após período de incubação.

4.3. Identificação fenotípica

4.3.1. Análise morfológica

4.3.1.1. Macroscopia

Para análise macroscópica, as estirpes fúngicas foram cultivadas em PDA. A fim de garantir a mesma altura média e um crescimento normalizado, foram adicionados 10 mL de meio a todas as placas de petri (diâmetro de 60 mm). Cada placa foi inoculada e incubada no escuro, a 25°C, durante 7 dias.

4.3.1.2. Microscopia

Para análise microscópica, as estirpes fúngicas foram cultivadas em PDA durante 5 dias a 25°C. Efetuaram-se preparações com micélio esporulado em azul de lactofenol. Observaram-se as estruturas reprodutoras assexuadas, características das estirpes utilizando o microscópico ótico (Leica MZ12.5).

4.3.2. MALDI-TOF MS

As amostras para análise espectral por MALDI-TOF MS foram cultivadas em PDA e incubadas no escuro, a 25°C, durante 4 dias. Aproximadamente 10 µg de esporos e micélio jovem de cada espécie foi transferido diretamente da placa de cultura para um microtubo. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de matriz [7,5% de ácido 2,5-dihidroxibenzóico em etanol/água/acetonitrilo (1:1:1) com ácido trifluoroacético a 0,03%] às amostras e agitadas no vortex (Rodrigues et al., 2011).

A mistura das amostras foram transferidas para as placas de MALDI-TOF MS e secas à temperatura ambiente. As análises foram realizadas no Laboratório de Micologia e Biologia Molecular do Centro de Engenharia Biológica num sistema Axima LNR

(Kratos Analytical; Shimadzu, UK) equipado com um laser de azoto (337 nm), onde a intensidade deste foi fixada imediatamente acima do limiar para produção de iões.

A faixa de massa m/z = 2-20 kDa foi gravada usando o modo linear com um atraso de 104 ns e usando uma voltagem de aceleração de 20 kV. Os espectros finais foram gerados pela soma de 20 disparos de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de até 1000 disparos de laser por espectro somados.

As listas de picos das estirpes selecionadas foram transferidas diretamente para o *software* SARAMIS® (AnagnosTec, Alemanha), onde foram comparadas com espectros de referência.

4.4. Caracterização molecular

4.4.1. Extração do DNA genómico

O protocolo utilizado para o isolamento do DNA das estirpes em estudo foi adaptado a partir de dois métodos muito utilizados para extração de DNA de fungos filamentosos: o método das microsferas (Sambrook et al.,1989) e o método do tiocianato de guanidina (adaptado de Pitcher et al., 1989; Martins et al., 2013). As estirpes fúngicas foram cultivadas em meio PDA durante 7 dias a 25°C, sendo o micélio recolhido e triturado. A lise celular foi efetuada ressuspendendo as células em 700 µL de tampão de lise (pH 8) num microtubo de 2 mL e adicionando 300 µL de microesferas (425-600 µm de diâmetro). Após agitação no vortex (Heidolph Reax 2000) à velocidade máxima durante 3 minutos, a suspensão foi colocada a 65°C durante 1 hora. Após incubação, as células foram novamente agitadas no vortex durante 2 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido para outro microtubo de 2 mL e adicionaram-se 500 µL de TE com RNase (100 µg/mL). Os microtubos foram incubados em banho de água a 37°C, durante 1 hora e, posteriormente, foram adicionados 500 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após mistura das fases, por inversão, procedeu-se a uma nova centrifugação a 10 000 rpm, durante 5 minutos.

O sobrenadante foi retirado para um novo microtubo de 2 mL e adicionado tampão acetato de sódio 3M a pH 5,2 na proporção de 1/10 do volume de misturado por inversão. Adicionaram-se 2,5 volumes de etanol absoluto (-20°C) e a mistura foi homogeneizada por inversão. A mistura foi centrifugada a 13 000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante decantado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol a 70% (v/v) e centrifugado a 10 000 rpm durante 10 minutos. Após secagem na estufa entre 30 e 37°C, durante 5 a 10 minutos, o DNA foi solubilizado em 100 µL de tampão TE e guardado a -20°C.

4.4.2. Quantificação do DNA por espectrometria

O DNA foi quantificado por espectrometria num espectrómetro (NanoDrop 1000). A absorvância das soluções de DNA foi lida aos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A densidade ótica de 1 U a 260 nm corresponde aproximadamente a uma concentração de DNA de 50 µg/mL. A razão de Abs_{260}/Abs_{280} dá uma indicação da pureza da amostra de DNA, sendo o valor ótimo de 1,8 (Sambrook et al., 1989).

4.4.3. M13-PCR

A amplificação das amostras de DNA foi efetuada por MSP-PCR tendo sido utilizado como *primer* uma sequência do fago M13 com 15 pares de bases. O *primer* designado por M13 (Invitrogen) apresenta a seguinte sequência: 5' – GAG GGT GGC GGT TCT – 3'.

Na reação de amplificação, o DNA genómico a analisar (25 ng/µL) foi incubado com uma mistura de reação constituída por: 5 µL de tampão de reação com $MgCl_2$ (concentrado 10X), 5 µL da mistura de DNTPs (2mM), 2 µL de *primer* M13 (50µM), 1 Unidade de *Taq* DNA polimerase (ThermoScientific) e água ultrapura esterilizada para um volume total de 50 µL.

As reações foram efetuadas em duplicado. Foi preparado um microtubo controlo (branco) em que o DNA foi substituído por água ultrapura esterilizada. Procedeu-se à amplificação utilizando um termociclador (Eppendorf, Mastercycler personal). O programa de amplificação compreende, após um período de desnaturação de 5 minutos a 94°C, um conjunto de 40 ciclos com a seguinte estrutura:

Desnaturação – 1 min a 94°C

Annealing – 1 min a 50°C

Extensão – 2 min a 72°C

aos quais se segue um período de extensão final de 6 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram guardados a - 20°C até à execução da eletroforese em gel para posterior análise. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5X concentrado. Os géis foram carregados com 5 µL de cada amostra de DNA amplificado e 5 µL de corante 2X (ANEXO II). Como marcador de massas molares utilizou-se o padrão DNA 100 bp Plus (ThermoScientific).

O gel foi submetido a uma voltagem de 90 V durante 3 horas. Após coloração numa solução de brometo de etídio (5 µg/mL) durante 5 min o gel foi observado sob luz UV a 302 nm utilizando um transiluminador de UV Bio-Rad Gel Doc™ e a imagem foi integrada com o recurso ao sistema Bio-Rad Quantity One® acoplado ao computador. A análise das bandas para análise da homologia através da correlação de Pearson e construção de dendogramas baseado no grau de similaridade através do método UPGMA foi efetuada recorrendo ao *software* Gel Doc XR (BioRad).

4.4.4. **Amplificação e sequenciação da região ITS**

A amplificação das amostras de DNA foi efetuada por PCR tendo sido utilizados como *primers* universais, duas sequências sendo elas: ITS4 (Invitrogen) 5' – CCT CCG CTT ATT GAT ATG C – 3' e ITS5 (Invitrogen) 5' – GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G – 3'.

Na reação de amplificação, o DNA genómico a analisar (25 ng/µL) foi incubado com uma mistura de reação constituída por: 5 µL de tampão de reação com $MgCl_2$ (concentrado 10X), 5 µL da mistura de DNTPs (2mM), 1 µL de *primer* ITS4 (50µM), 1 µL de *primer* ITS5 (50µM), 1 Unidade de *Taq* DNA polimerase (ThermoScientific) e água ultrapura esterilizada para um volume total de 50 µL.

As reações foram efetuadas em duplicado. Foi preparado um microtubo controlo (branco) em que o DNA foi substituído por água ultrapura esterilizada. Procedeu-se à amplificação utilizando um termociclador (Eppendorf, Mastercycler personal). O

programa de amplificação compreende, após um período de desnaturação de 3 minutos a 94°C, um conjunto de 35 ciclos com a seguinte estrutura:

> Desnaturação – 1 min a 94°C
> *Annealing* – 1 min a 55°C
> Extensão – 1 min a 72°C

aos quais se segue um período de extensão final de 5 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram guardados a - 20°C até à execução da eletroforese em gel para posterior análise. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 0,5X concentrado. Os géis foram carregados com 5 µL de cada amostra de DNA amplificado e 5 µL de corante 2X. Como marcador de massas molares utilizou-se o padrão DNA 100 pb Plus (ThermoScientific). O gel foi submetido a uma voltagem de 90 V durante 1 hora. Após coloração numa solução de brometo de etídio (5 µg/mL) durante 5 min o gel foi observado sob luz UV a 302 nm utilizando um transiluminador de UV Bio-Rad Gel Doc™ e a imagem foi integrada com o recurso ao sistema Bio-Rad Quantity One® acoplado ao computador.

Os produtos amplificados por PCR foram purificados com recurso ao *QIAquick Extraction Gel kit* (QIAGEN). Os fragmentos de DNA foram retirados do gel de agarose para um microtubo de 2mL e adicionados 3 volumes de tampão QG para um volume de gel. O microtubo foi incubado a 50°C durante 10 minutos, sendo depois agitados no vortex 2 a 3 minutos para a completa dissolução do gel. Depois do gel estar dissolvido, foi adicionado 1 volume de isopropanol à amostra e misturado por inversão.

A mistura foi transferida para uma coluna de *spin* e centrifugada durante 1 minuto a 13 000 rpm, sendo posteriormente, descartado o sobrenadante. Foram adicionados 500 µL de tampão QG à coluna de *spin* e centrifugada novamente durante 1 minuto a 13 000 rpm, com o descarte do sobrenadante. Após, foram adicionados 750 µL de tampão PE à coluna de *spin*, deixou-se repousar 2 min e procedeu-se à centrifugação durante 1 min a 13 000 rpm, onde se descartou o sobrenadante. Posteriormente, a coluna de *spin* foi colocada num microtubo de 1,5 mL. Para eluição do DNA, foram adicionados 50 µL de tampão BE (10 mM tris Cl pH 8,5) para o centro da membrana da coluna de *spin*, incubado 4 min à temperatura ambiente e posteriormente, centrifugado durante 1 min a 13 000 rpm.

A sequenciação foi efetuada por prestação de serviços à STABVIDA, tendo sido utilizado o método de *Sanger* (Walker, 2013). O alinhamento múltiplo das sequências ITS5-ITS4 foi efetuado no programa Bioedit, utilizando o ClustalW.

A árvore filogenética foi construída pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) por uma análise de *bootstrap* com 1000 repetições, através do programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Na construção da árvore filogenética foram consideradas as sequências da região ITS dos fungos em estudo (Tabela 3), bem como outras sequências da mesma região (18S RNA parcial seq., ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA parcial seq.) de estirpes de *Absidia* spp., *Circinella* spp., *Cunninghamella* spp., *Gongronella* spp. e *Rhizopus* spp. disponíveis no *Genbank*, base de dados NCBI [1], com intervalo de homologia entre 98- 100% descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Descrição das estirpes e número de acesso *GenBank*.

Nº da Estirpe	Espécie	Nº de acesso GenBank ITS
CBS 125.68	*Absidia anomala*	JN205815
CBS 314.78	*Absidia californica*	JN205816
CBS 100.08	*Absidia cylindrospora var. cylindrospora*	JN205822
CBS 102.35	*Absidia fusca*	JN205814
CBS 101.08	*Absidia glauca*	JN205810
CBS 106.08	*Absidia spinosa var. spinosa*	JN205827
CBS 172.62	*Circinella angarensis*	JN205848
CBS 140.28	*Circinella chinensis*	JN205855
CBS 142.81	*Circinella minor*	JN205861
CBS 141.28	*Circinella muscae*	JN205853
CBS 101.16	*Circinella umbelata*	JN205857
CBS 433.84	*Cunninghamella blakesleeana*	JN205867
CBS 782.68	*Cunninghamella blakesleeana*	JN205869
CBS 100178	*Cunninghamella clavata*	JN205890
CBS 156.28	*Cunninghamella echinulata*	JN205895
CBS 656.85	*Cunninghamella echinulata*	JN205896
CBS 158.28	*Cunninghamella binariae*	JN205888
CBS 167.53	*Cunninghamella elegans*	JN205882
CBS 773.68	*Cunninghamella elegans*	JN205887
CBS 168.53	*Cunninghamella homothallica*	JN205863
CBS 692.68	*Cunninghamella phaeospora*	JN205864
CBS 779.68	*Cunninghamella polymorpha*	JN205874
ATCC 8989	*Gongronella butleri*	GU244499
CBS 216.58	*Gongronella butleri*	JN206285
CBS 179.28	*Gongronella butleri*	JN206286
CBS 102.44	*Gongronella butleri*	JN206284
CBS 969.73	*Gongronella butleri*	JN206287
ATCC 244.12	*Gongronella lacrispora*	GU244498
CCMI 1101	*Gongronella* sp.	GU244500
ATCC 20344	*Rhizopus oryzae*	JQ745257
CBS 258.28	*Rhizopus oryzae*	DQ641291
CBS 266.30	*Rhizopus oryzae*	DQ641292
CBS 321.35	*Rhizopus oryzae*	AY213684
CBS 395.95	*Rhizopus oryzae*	AY213684
ATCC 10437	*Rhizopus stolonifer*	AY625075
ATCC 6227b	*Rhizopus stolonifer*	AF543526
CBS 150.83	*Rhizopus stolonifer var. stolonifer*	AB113022
CBS 609.82	*Rhizopus stolonifer var. stolonifer*	AB113023

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação do DNA genómico

O DNA foi quantificado por espectrometria de absorção molecular, tendo sido efetuadas leituras de absorvância a 260 e 280 nm, para também avaliar o grau de pureza da amostra (Tabela 5, Anexo II).

Os valores obtidos a 260 nm permitiram avaliar a concentração de DNA presente, tendo sido efetuadas diluições das amostras mais concentradas, de modo a obter a concentração adequada para a amplificação da região ITS e por M13-PCR.

A razão de Abs_{260}/Abs_{280} mostrou que a maioria das amostras apresentou um grau de pureza adequado, isto é, sem contaminação proteica, considerando-se como ótimo o valor de 1,8 (Sambrook et al., 1989).

5.2. Análise morfológica

Os fungos *Mucorales* em estudo dividem-se entre os géneros *Absidia, Circinella, Cunninghamella, Gongronella e Rhizopus*. Tradicionalmente, são classificados pelas suas características morfológicas, quer pela observação macroscópica das colónias, bem como a observação microscópica das estruturas vegetativas (micélio) e estruturas reprodutoras (esporângio, esporangióforos e esporangiósporos) (Hoffman et al., 2013).

As estirpes fúngicas isoladas foram identificadas por observação macroscópica das colónias maduras em PDA, sendo apresentadas nas Figuras 4 a 7.

Os isolados do género *Gongronella* (Figuras 4 e 5), apresentaram um crescimento relativamente lento (7 a 8 dias), em relação aos restantes isolados em estudo, colónias brancas (*G. butleri*) e acinzentadas (*G. lacrispora*), sendo que estas últimas apresentam menor dimensão. O reverso das colónias não apresentam alterações em relação ao anverso, nem pigmentação.

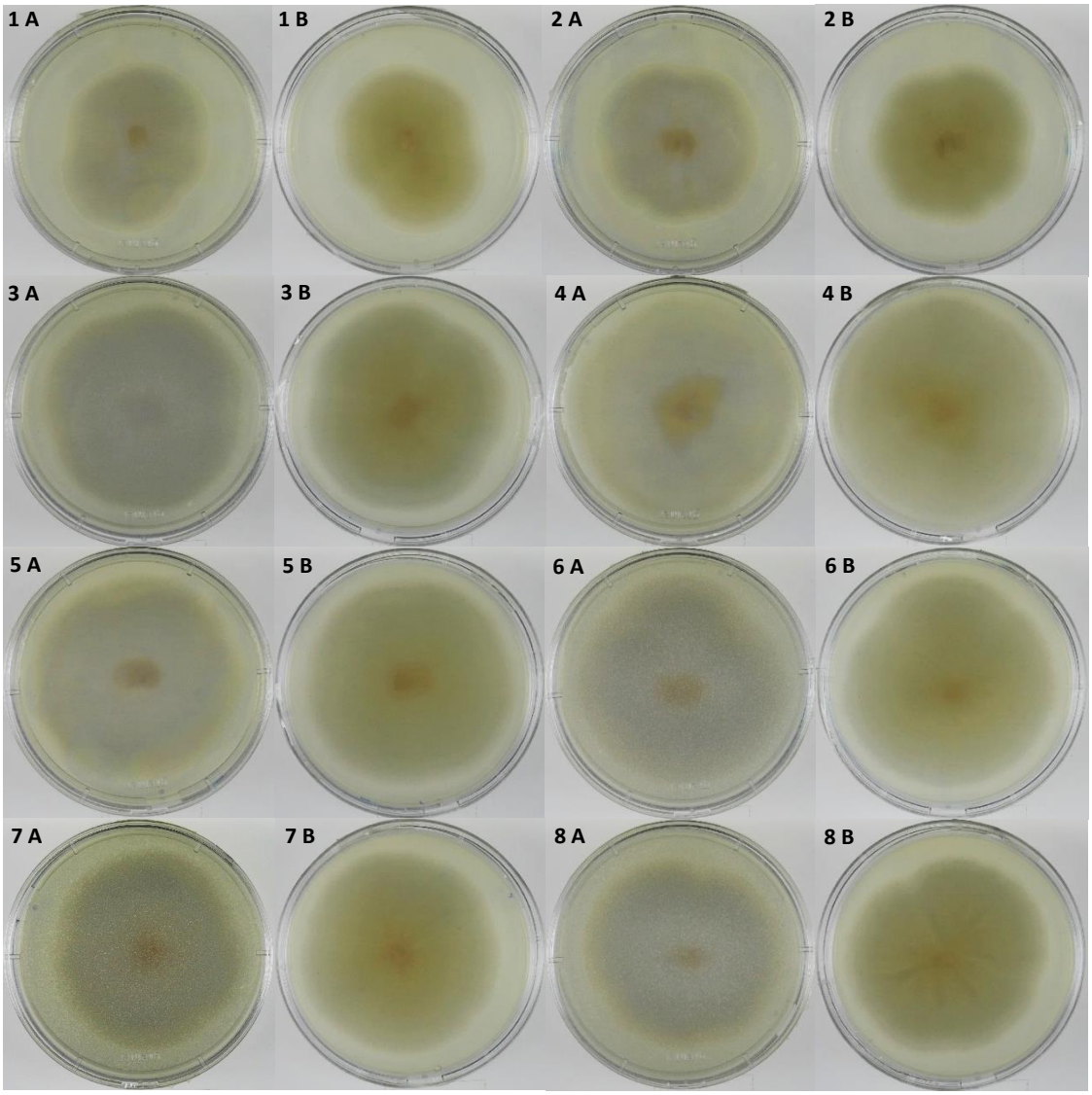

Figura 4 – Aspeto macroscópico das colónias de *Gongronella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso.
1- *Gongronella* sp. CCMI 1101; 2- *Gongronella* sp. CCMI 1100; 3- *Gongronella butleri* ATCC 8989; 4- *Gongronella butleri* CBS 227.36; 5- *Gongronella butleri* CBS 179.28; 6- *Gongronella butleri* CBS 157.25; 7- *Gongronella butleri* CBS 228.36; 8- *Gongronella butleri* CBS 216.58.

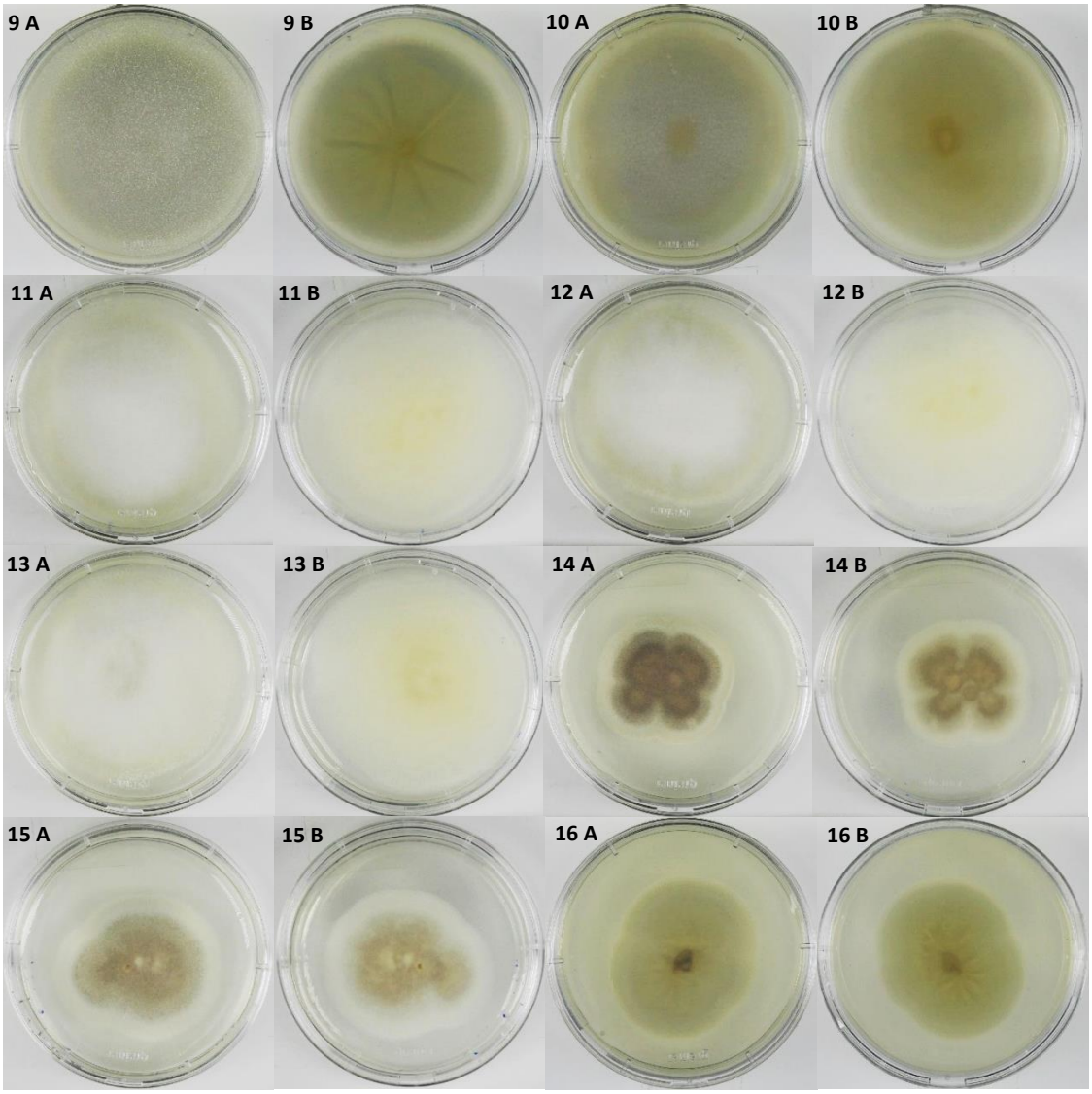

Figura 5 – Aspeto macroscópico das colónias de *Gongronella* spp. e *Circinella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso.
9- *Gongronella butleri* CBS 259.52; 10- *Gongronella butleri* CBS 194.60; 11- *Gongronella butleri* CBS 102.44; 12- *Gongronella butleri* CBS 610.94; 13- *Gongronella butleri* CBS 969.73; 14- *Gongronella lacrispora* ATCC 244.12; 15- *Gongronella lacrispora* CBS 244.62; 16- *Circinella lacrimispora* CBS 101757.

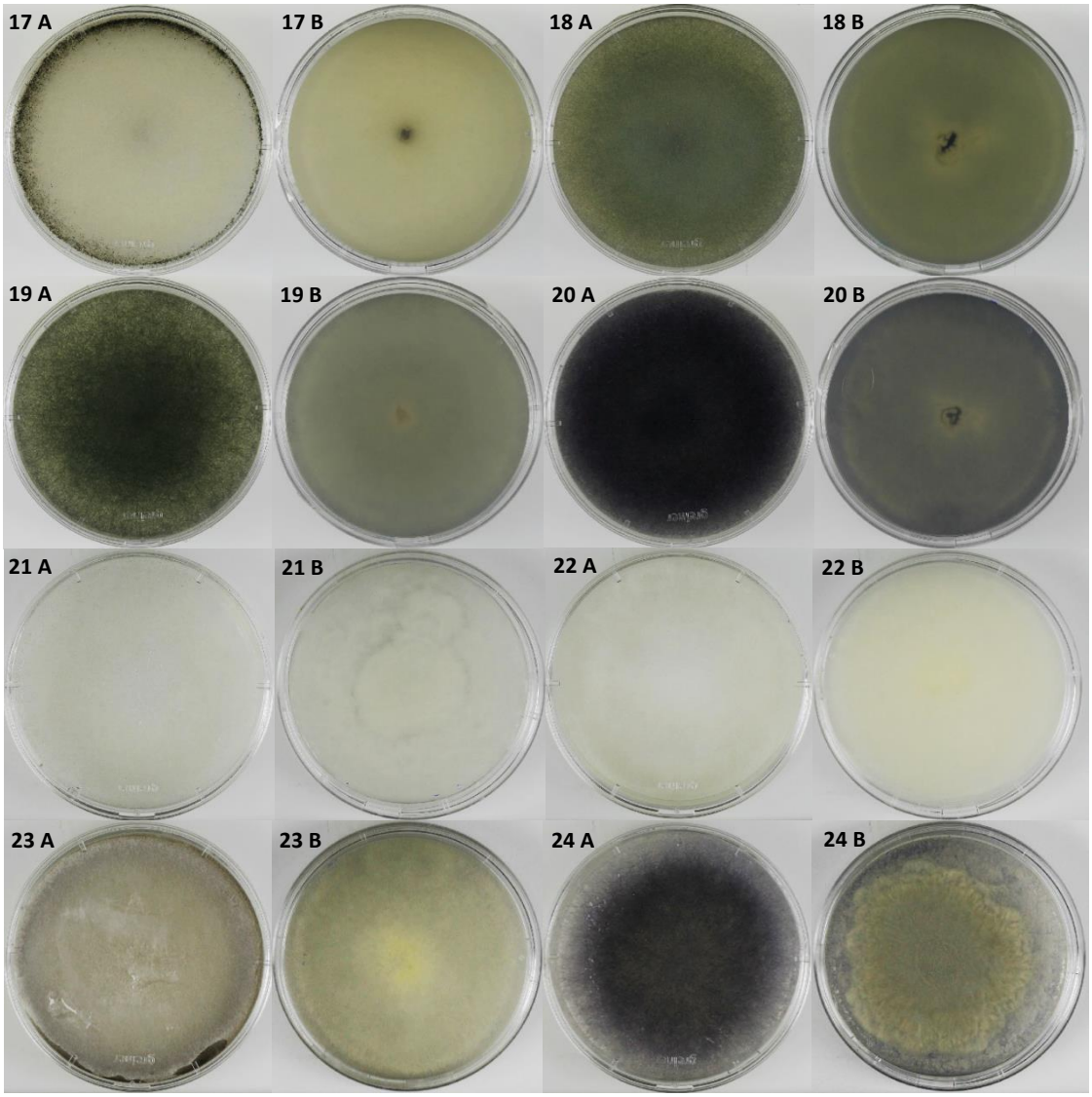

Figura 6 – Aspeto macroscópico das colónias de *Circinella* spp. e *Absidia* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso.
17- *Circinella simplex* CCMI 24; 18- *Absidia glauca* CBS 101.08; 19- *Absidia glauca* CCMI 91; 20- *Absidia coerulae* CBS 104.08; 21- *Absidia blakesleeana* CBS 100.28; 22- *Absidia cuneospora* CBS 101.59; 23- *Absidia parricida* CBS 174.67; 24- *Absidia anomala* CBS 125.68.

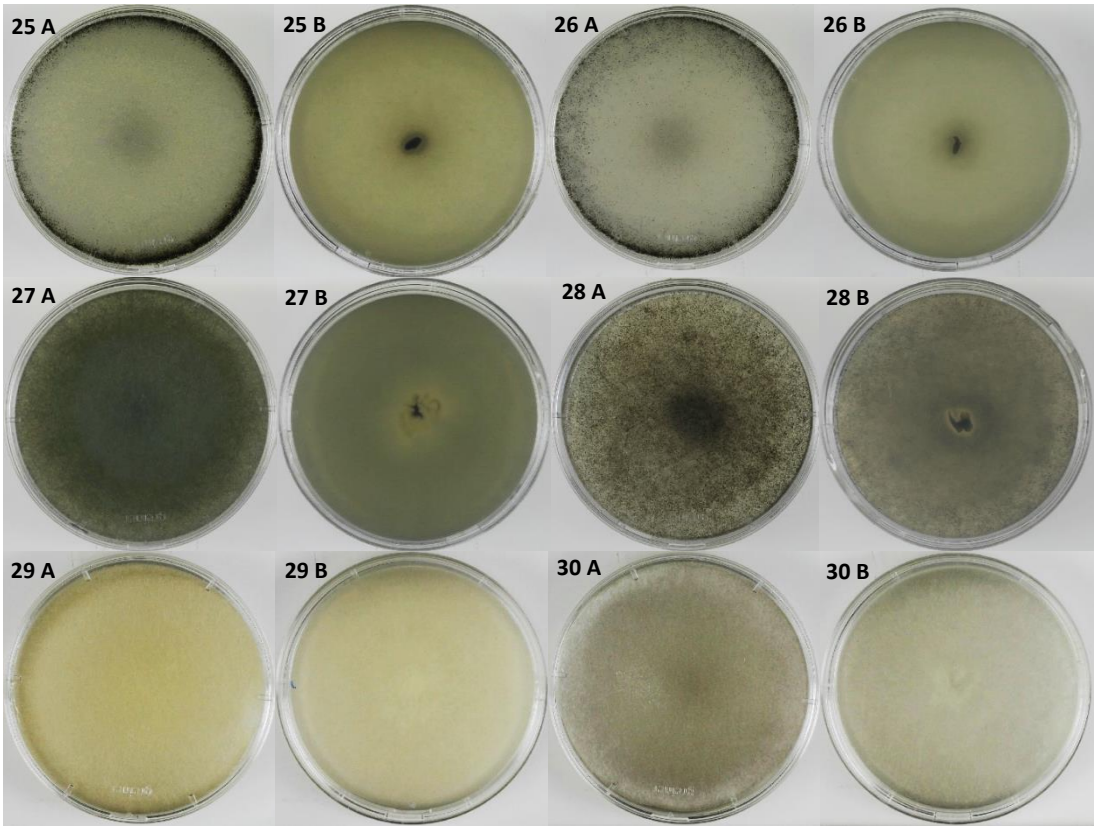

Figura 7 – Aspeto macroscópico das colónias de *Rhizopus* spp. e *Cunninghamella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C. A- anverso, B- reverso.
25- *Rhizopus stolonifer* CCMI 1105; 26- *Rhizopus stolonifer* CCMI 1104; 27- *Rhizopus stolonifer var. stolonifer* CBS 403.51; 28- *Rhizopus oryzae* CCMI 900; 29- *Cunninghamella echinulata* CBS 156.28; 30- *Cunninghamella elegans* CBS 481.66.

Os isolados do género *Absidia* (Figura 6), apresentaram um crescimento rápido (3 a 5 dias), em relação às estirpes *Gongronella* spp., colónias com micélio muito ramificado preenchendo toda a placa, sendo de cor branca para as estirpes *Absidia blakesleeana, A. cuneospora e A. parricida*, de cor roxa para as estirpes *A. coerulae e A. anomala* e de cor verde para as estirpes de *A. glauca*. O reverso das colónias não apresentaram alterações em relação ao anverso, nem pigmentação.

Os isolados do género *Circinella* (Figura 6 e 7), apresentaram tempos de crescimento diferentes, sendo que a estirpe *C. simplex* ao fim de 3 dias já tinha micélio de cor branca e preta preenchendo quase a totalidade da placa, e a estirpe *C. lacrimispora* apenas apresentou coloração do micélio ao fim de 5 dias. A estirpe *C. lacrimispora* apresentou uma cor hialina e de menor dimensão em relação à estirpe do mesmo género.

O reverso de ambas colónias não apresentaram alterações em relação ao anverso, nem pigmentação.

Os isolados do género *Rhizopus* (Figura 7), foram os que apresentaram um crescimento mais rápido de todas as estirpes em estudo, pois com apenas 3 dias já apresentavam micélio que preenchia a totalidade da superfície das placas. As colónias apresentaram-se de cor branca e preta para as estirpes *R. stolonifer* CCMI 1105 e *R. stolonifer* CCMI 1104, e de cor preta para as estirpes *R. oryzae* CCMI 900 e *R. stolonifer var. stolonifer* CBS 403.51. O reverso das colónias não apresentaram alterações em relação ao anverso, nem pigmentação.

Os isolados do género *Cunninghamella* (Figura 7), apresentaram um crescimento relativamente rápido (3 a 5 dias), comparativamente às estirpes *Gongronella* spp., colónias com micélio branco muito ramificado preenchendo toda a placa. O reverso das colónias não apresentaram alterações em relação ao anverso, nem pigmentação.

As principais características dos fungos *Mucorales* a nível microscópico são: a presença de esporângios mais ou menos globosos, e uma columela de diferentes tamanhos e formas, sendo considerada como sinapomórfica para estes (Hoffman et al., 2013). Estas estruturas são apresentadas nas Figuras 8 e 9.

Os isolados do género *Gongronella* (Figura 8), apresentaram esporangióforos eretos e por vezes ramificados, esporângios globosos e uma pequena columela. Os esporangiósporos das estirpes *G. lacrispora* apresentaram-se sob a forma de "lágrima" com maiores dimensões quando comparados com os esporangiósporos das estirpes *G. butleri*. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Ribaldi (1952).

Os isolados do género *Circinella* (Figuras 7 e 8), apresentaram grandes diferenças entre eles. A estirpe *C. lacrimispora* CBS 101757 apresentou esporangióforos eretos, esporângios globosos, uma pequena columela e esporangiósporos em forma de "lágrima". Por sua vez, a estirpe *C. simplex* CCMI 24 apresentou esporangióforos eretos, esporângios multi-esporulados de grandes dimensões, columela apofisada e esporangiósporos de maiores dimensões em relação aos da estirpe anterior.

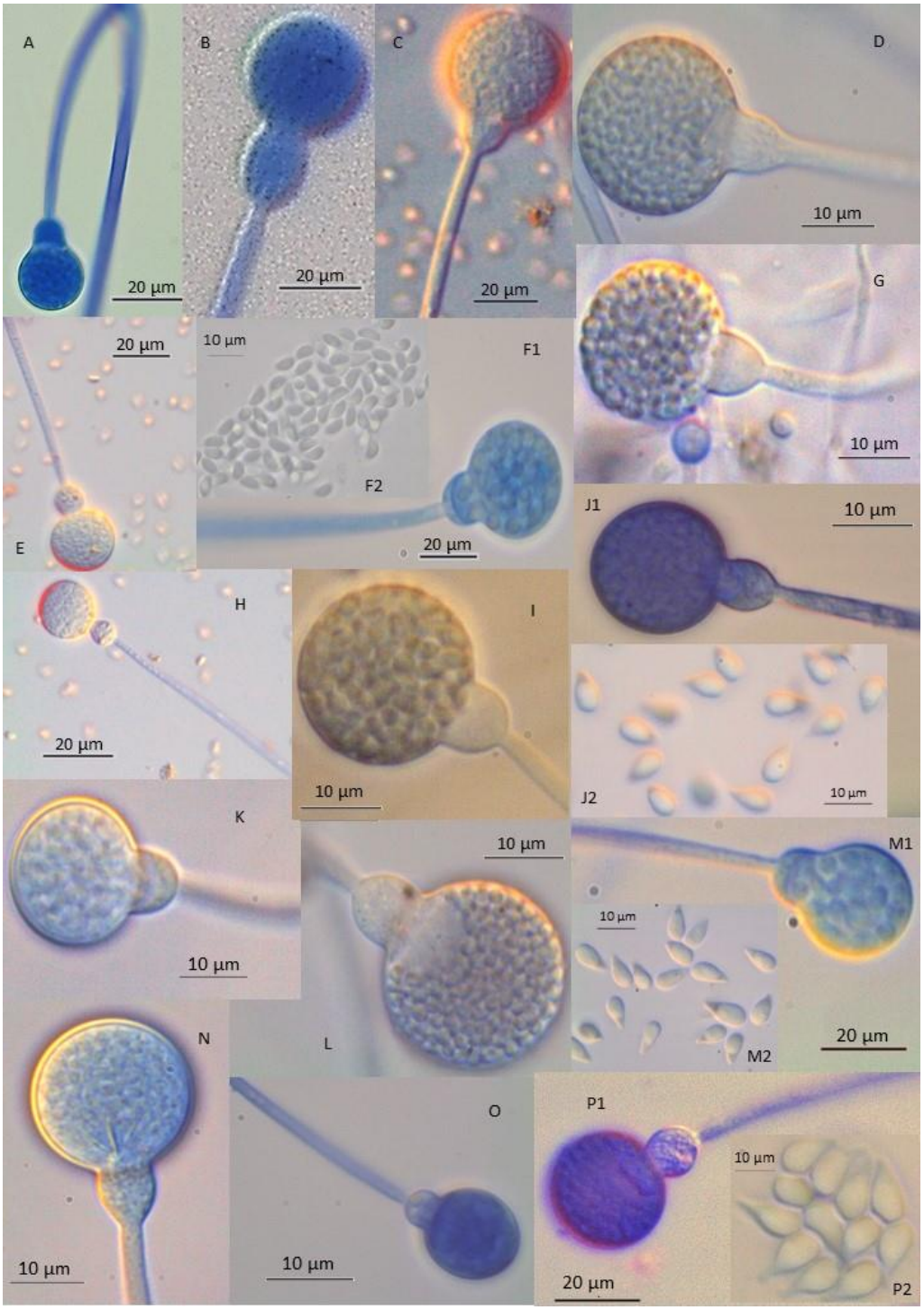

Figura 8 - Estruturas reprodutoras de *Gongronella* spp. e *Circinella* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C.
A- *Gongronella* sp. CCMI 1101; B- *Gongronella butleri* ATCC 8989; C- *Gongronella butleri* CBS 228.36; D- *Gongronella butleri* CBS 227.36; E- *Gongronella butleri* CBS 179.28; F1- *Gongronella* sp. CCMI 1100; F2- esporos de *Gongronella* sp. CCMI 1100; G- *Gongronella butleri* CBS 610.94; H- *Gongronella butleri* CBS 259.52; I- *Gongronella butleri* CBS 102.44; J1- *Gongronella lacrispora* ATCC 244.12; J2- esporos de *Gongronella lacrispora* ATCC 244.12; K- *Gongronella butleri* CBS 969.73; L- *Gongronella butleri* CBS 216.58; M1- *Gongronella lacrispora* CBS 244.62; M2- esporos de *Gongronella lacrispora* CBS 244.62; N- *Gongronella butleri* CBS 194.60; O- *Gongronella butleri* CBS 157.25; P1- *Circinella lacrimispora* CBS 101757; P2- esporos de *Circinella lacrimispora* CBS 101757.

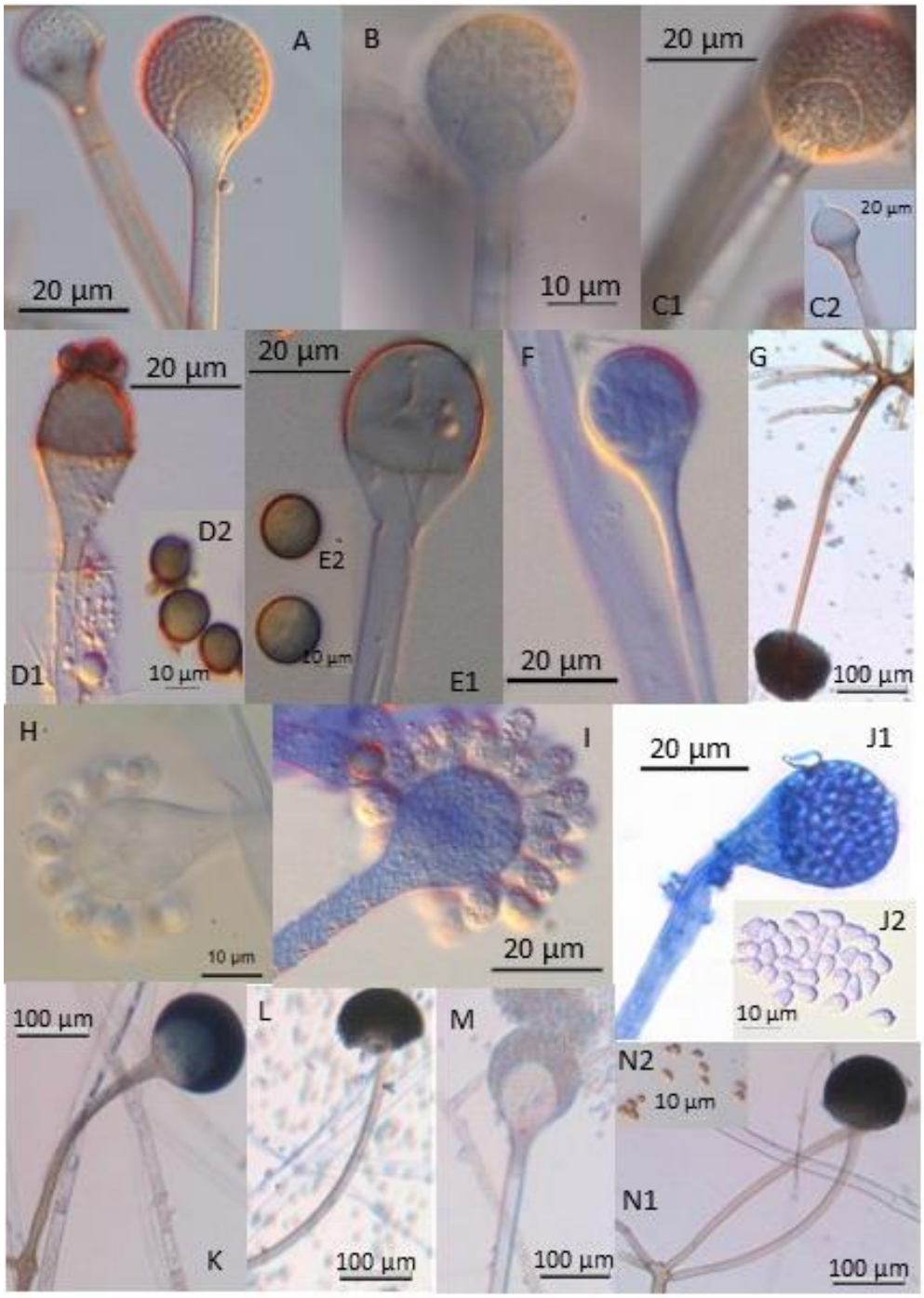

Figura 9 - Estruturas reprodutoras de *Absidia* spp., *Cunninghamella* spp. *Circinella* spp. e *Rhizopus* spp., após um crescimento em PDA durante 7 dias, a 25°C.
A- *Absidia glauca* CBS 101.08; B- *Absidia glauca* CCMI 91; C1- *Absidia coerulae* CBS 104.08; C2- columela de *Absidia coerulae* CBS 104.08; D1- *Absidia parricida* CBS 174.67; D2- esporos de *Absidia parricida* CBS 174.67; E1- *Absidia blakesleeana* CBS 100.28; E2- esporos de *Absidia blakesleeana* CBS 100.28; F- *Absidia anomala* CBS 125.68; G- *Rhizopus oryzae* CCMI 900; H- *Cunninghamella echinulata* CBS 156.28; I- *Cunninghamella elegans* CBS 481.66; J1- *Absidia cuneospora* CBS 101.59; J2- esporos de *Absidia cuneospora* CBS 101.59; K- *Rhizopus stolonifer* CCMI 1104; L- *Circinella simplex* CCMI 24; M- *Rhizopus stolonifer var. stolonifer* CBS 403.51; N1- *Rhizopus stolonifer* CCMI 1105; N2- esporos de *Rhizopus stolonifer* CCMI 1105.

Os isolados do género *Absidia* (Figura 9), apresentaram esporangióforos eretos e por vezes ramificados, esporângios multi-esporulados piriformes e columelas de diferentes formas (apical ou cónica). Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Tieghem (1878).

Os isolados do género *Cunninghamella* (Figura 9), apresentaram esporangióforos eretos por vezes ramificados, que terminam em vesiculas globosas cobertas por pequenos esporângios elipsoidais. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Matruchot (1903).

Os isolados do género *Rhizopus* (Figura 9), apresentaram esporangióforos eretos que surgem entre rizoides distintos, esporângios multi-esporulados de grandes dimensões e columela apofisada. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Ehrenberg (1820).

O reconhecimento das espécies é um passo essencial para a classificação de taxa superiores. A morfologia desempenhou assim, um papel importante em conceitos tradicionais de espécies de fungos. Dependendo das condições experimentais, a morfologia pode variar profundamente, e hoje mostra-se inadequada para definir espécies da ordem *Mucorales* se não forem combinados com dados moleculares (Hoffman et al.,2013).

5.3. Filogenia

A amplificação da região ITS apresenta uma vantagem sobre os outros *loci*, devido à presença de *primers* universais que gera diversificadas sequências que permitem distinguir entre taxa até ao nível da espécie (Schwarz et al., 2006).

Os produtos de PCR resultantes de cada reação de amplificação da região ITS apresentaram um número variavel de bandas compreendidas entre os 700 e 900 pb, como observamos, nas Figuras 10 a 12.

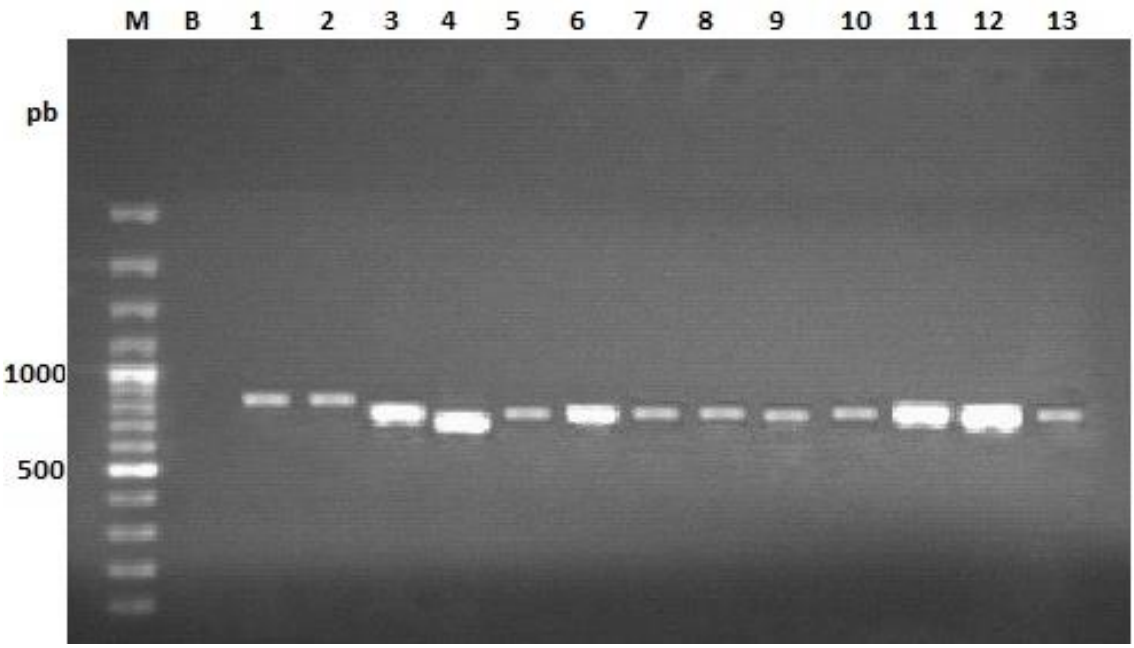

Figura 10 - Eletroforese dos produtos de PCR da região ITS das estirpes de *Gongronella* spp.
M- Marcador 100 pb plus; B- Branco; 1- *Gongronella* sp. CCMI 1101; 2- *Gongronella* sp. CCMI 1100; 3- *Gongronella butleri* ATCC 8989; 4- *Gongronella butleri* CBS 227.36; 5- *Gongronella butleri* CBS 179.28; 6- *Gongronella butleri* CBS 157.25; 7- *Gongronella butleri* CBS 228.36; 8- *Gongronella butleri* CBS 216.58; 9- *Gongronella butleri* CBS 259.52; 10- *Gongronella butleri* CBS 194.60; 11- *Gongronella butleri* CBS 102.44; 12- *Gongronella butleri* CBS 610.94; 13- *Gongronella butleri* CBS 969.73.

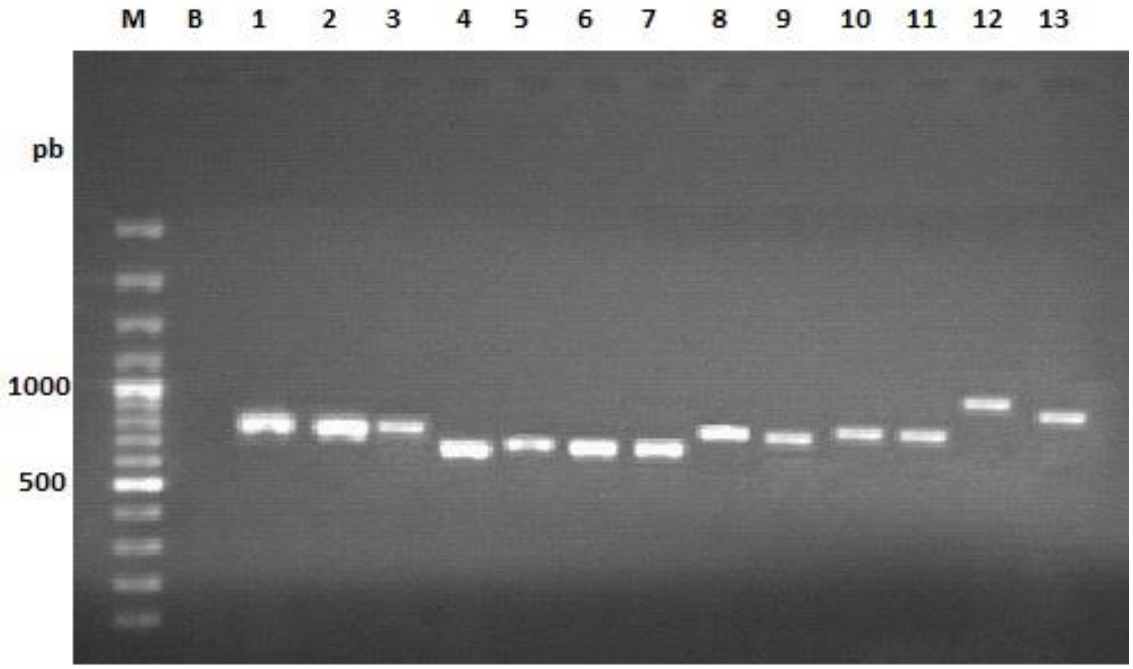

Figura 11 - Eletroforese dos produtos de PCR da região ITS das estirpes de *Gongronella* spp., *Absidia* spp. e *Cunninghamella* spp.
M- Marcador 100 pb plus; B- Branco; 1- Gongronella lacrispora ATCC 244.12; 2- Gongronella lacrispora CBS 244.62; 3- Circinella lacrimispora CBS 101757; 4- Circinella simplex CCMI 24; 5- Absidia glauca CBS 101.08; 6- Absidia glauca CCMI 91; 7- Absidia coerulae CBS 104.08; 8- Absidia blakesleeana CBS 100.28; 9- Absidia cuneospora CBS 101.59; 10- Absidia parricida CBS 174.67; 11- Absidia anomala CBS 125.68; 12- Cunninghamella echinulata CBS 156.28; 13- Cunninghamella elegans CBS 481.66.

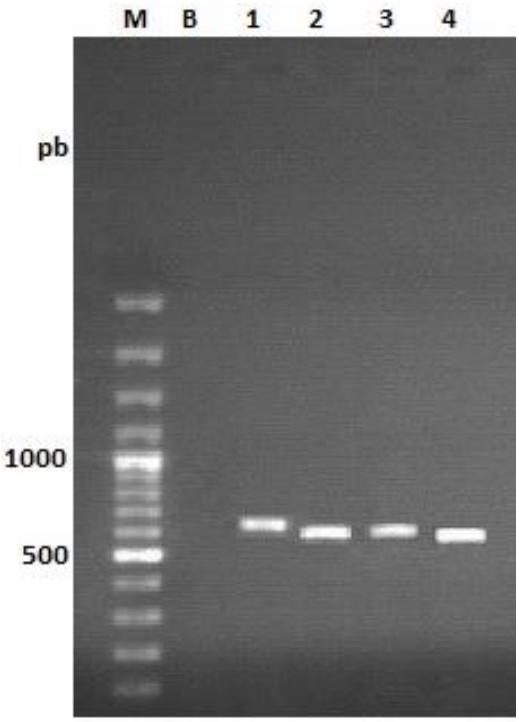

Figura 12 - Eletroforese dos produtos de PCR da região ITS das estirpes de *Rhizopus* spp.
M- Marcador 100 pb plus; B- Branco; 1- *Rhizopus stolonifer* CCMI 1105; 2- *Rhizopus stolonifer* CCMI 1104; 3- *Rhizopus stolonifer var. stolonifer* CBS 403.51; 4- *Rhizopus oryzae* CCMI 900.

A árvore filogenética construída com as sequências da região ITS das estirpes em estudo (Tabela 3), complementada com estirpes selecionadas a partir do banco de dados *Genbank* (Tabela 4) é apresentada na Figura 13, onde é possível observar a formação de 5 *clusters*: o *cluster* I formado pelo género *Cunnighamella* spp., o *cluster* II formado pelo género *Absidia* spp., o *cluster* III formado pelo género *Gongronella* spp., o *cluster* IV formado pelo género *Circinella* spp. e por último o *cluster* V formado pelo género *Rhizopus* spp.

O *cluster* I, apresentou-se bem definido e bem diferenciado com um BS de 96%, no qual as estirpes *Cunninghamella elegans* CBS 481.66 e *Cunnignhamella binariae* CBS 158.28 apresentaram um elevado grau de similaridade. Os resultados obtidos estão de acordo com o que foi descrito por Walther et al. (2013) tendo a estirpe CBS 481.66 sido reclassificada em *Cunninghamella binariae*.

O *cluster* II, apresentou um BS de 62% dada a grande divergência entre as espécies. O género *Absidia* apresenta-se com um grupo polifilético, em estudos filogenéticos baseados no gene actina (Voigt & Wöstemeyer, 2001), e na região ITS dividindo-se em micoparasitas (*A. parricida*), termotolerantes (*A. blakesleeana*) e mesofílicos (*A. anomala, A. spinosa, A. glauca, A. cylindrospora, A. cuneospora, A. coerulae e A. californica*) (Hoffman et al., 2007).

O *cluster* III, apresentou-se bem definido e bem diferenciado com um BS de 100%. Observamos que as estirpes *Circinella lacrimispora* CBS 101757 e *Gongronella lacrispora* ATCC 244.12 formaram um cluster com um BS de 100%, como também já descrito em estudos filogenéticos com base no locus LSU, tendo sido reclassificada a estirpe CBS 101757 em *Gongronella lacrispora* (Walther et al., 2013). As estirpes *Gongronella* sp. apresentaram valores de BS não consideráveis, pelo que estaremos perante uma putativa nova espécie do género *Gongronella*.

O cluster IV, apresentou-se bem definido e bem diferenciado com um BS de 100%, entre as espécies analisadas.

O *cluster* V, apresentou-se bem definido e bem diferenciado com um BS de 90%, entre as espécies analisadas, como já observado em estudos filogenéticos com base nos genes actina, SSU, LSU e fator de elongamento 1α (Gherbawy et al., 2009).

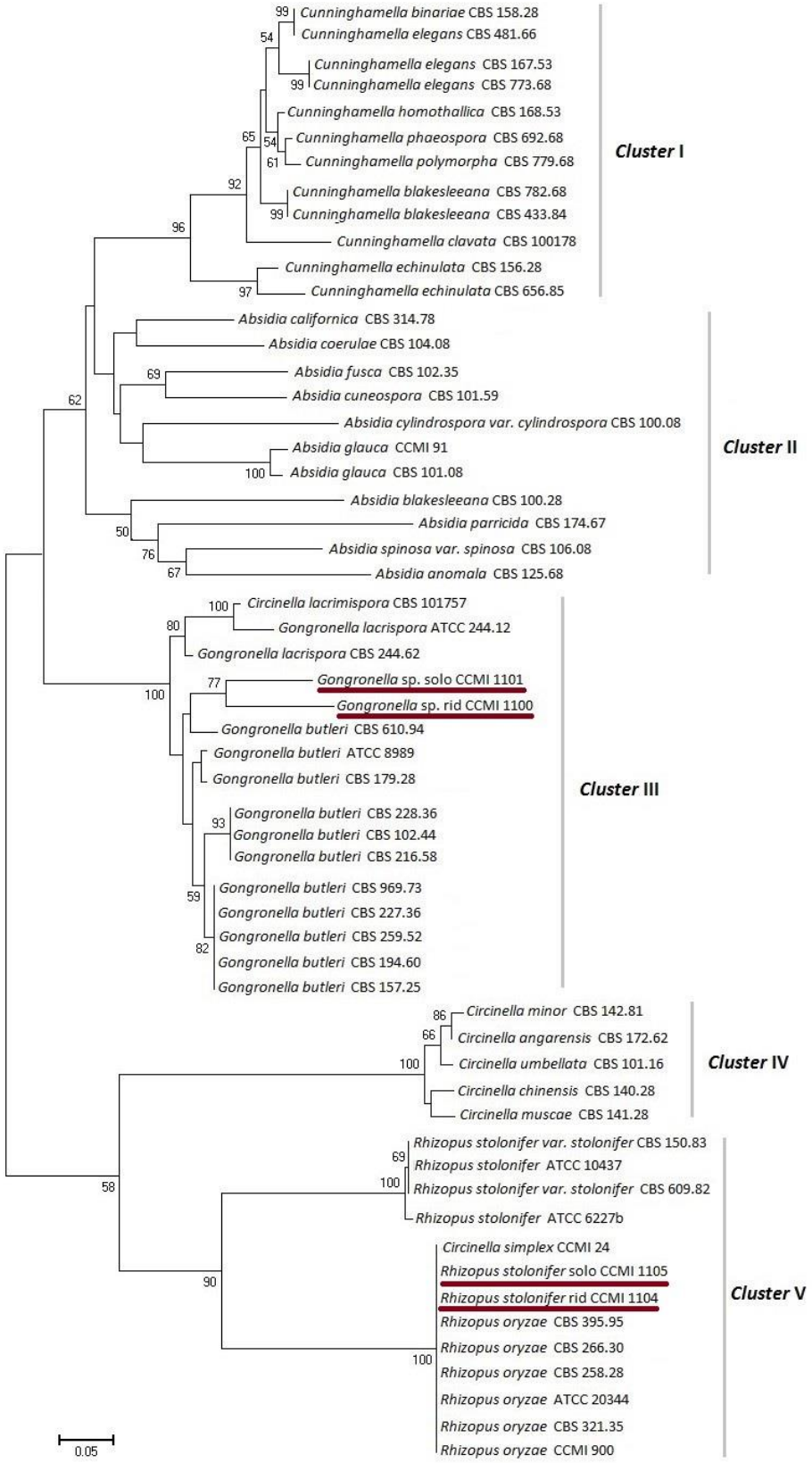

Figura 13- Árvore filogenética construída com base nas sequências da região ITS, utilizando o método de NJ com um valor de *bootstrap* 1000.

Observou-se que as estirpes *Rhizopus* st*olonifer* CCMI 1105, *R. stolonifer* CCMI 1104 e *C. simplex* CCMI 24 formaram um cluster com um BS de 100% com as estirpes *R. oryzae*, tendo sido possível reclassificar estas estirpes, como *Rhizopus oryzae*.

Os estudos filogenéticos nos *Mucorales* ainda são muito escassos comparativamente a outros grupos de fungos, sendo o estudo do DNA ribossomal o predominante. As sequências codificadoras de proteínas não são muito representadas, devido à falta de *primers* apropriados capazes de funcionar numa vasta gama de isolados, sendo que um problema que se encontra frequentemente é a sequenciação direta dos amplificados bem como a presença de genes parálogos (Schoch et al., 2012).

A caracterização fenotípica com base em caracteres morfológicos e bioquímicos, bem como a análise molecular de um ou, de preferência, várias sequências de DNA (*Multi Locus Sequence Typing*) são os métodos de uso corrente para identificação de espécies de confiança (Rodrigues et al., 2011).

5.4. M13-PCR e *fingerprinting*

A análise polimórfica da variabilidade genética das estirpes em estudo foi efetuada por M13-PCR. Os produtos resultantes de cada reação de M13-PCR apresentaram um número variável de bandas compreendidas entre os 300 e 3000 pb, como observamos nas Figuras 14 e 15.

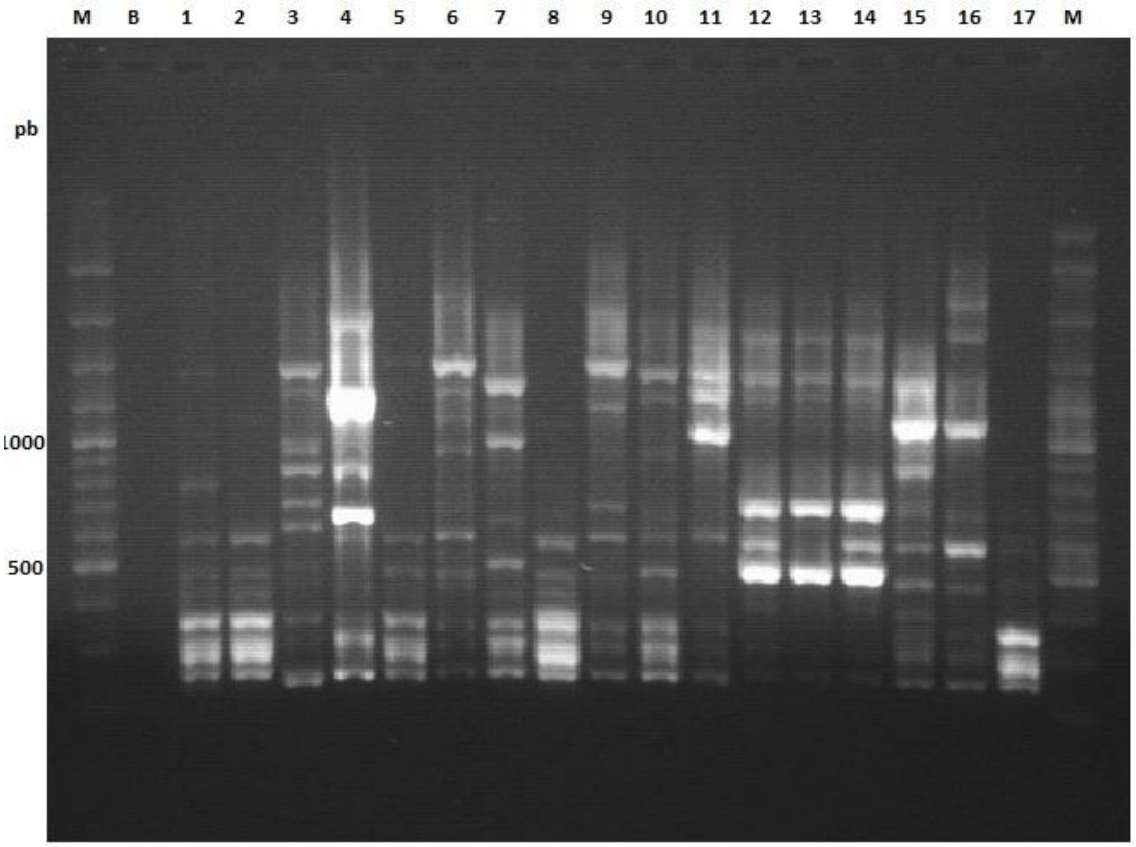

Figura 14 - Eletroforetograma obtido após M13-PCR para as estirpes de *Gongronella* spp.
M- Marcador 100 pb plus; B- Branco; 1- *Gongronella* sp. CCMI 1101; 2- *Gongronella* sp. CCMI 1100; 3- *Gongronella butleri* CBS 157.25; 4- *Gongronella butleri* ATCC 8989; 5- *Gongronella butleri* CBS 227.36; 6- *Gongronella butleri* CBS 228.36; 7- *Gongronella butleri* CBS 259.52; 8- *Gongronella butleri* CBS 179.28; 9- *Gongronella butleri* CBS 194.60; 10- *Gongronella butleri* CBS 102.44; 11- *Gongronella butleri* CBS 610.94; 12- *Gongronella lacrispora* CBS 101757; 13- *Gongronella lacrispora* ATCC 244.12; 14- *Gongronella lacrispora* CBS 244.62; 15- *Absidia glauca* CCMI 91; 16- *Gilbertella persicaria* CBS 403.51; 17- *Cunninghamella echinulata* CBS 156.28.

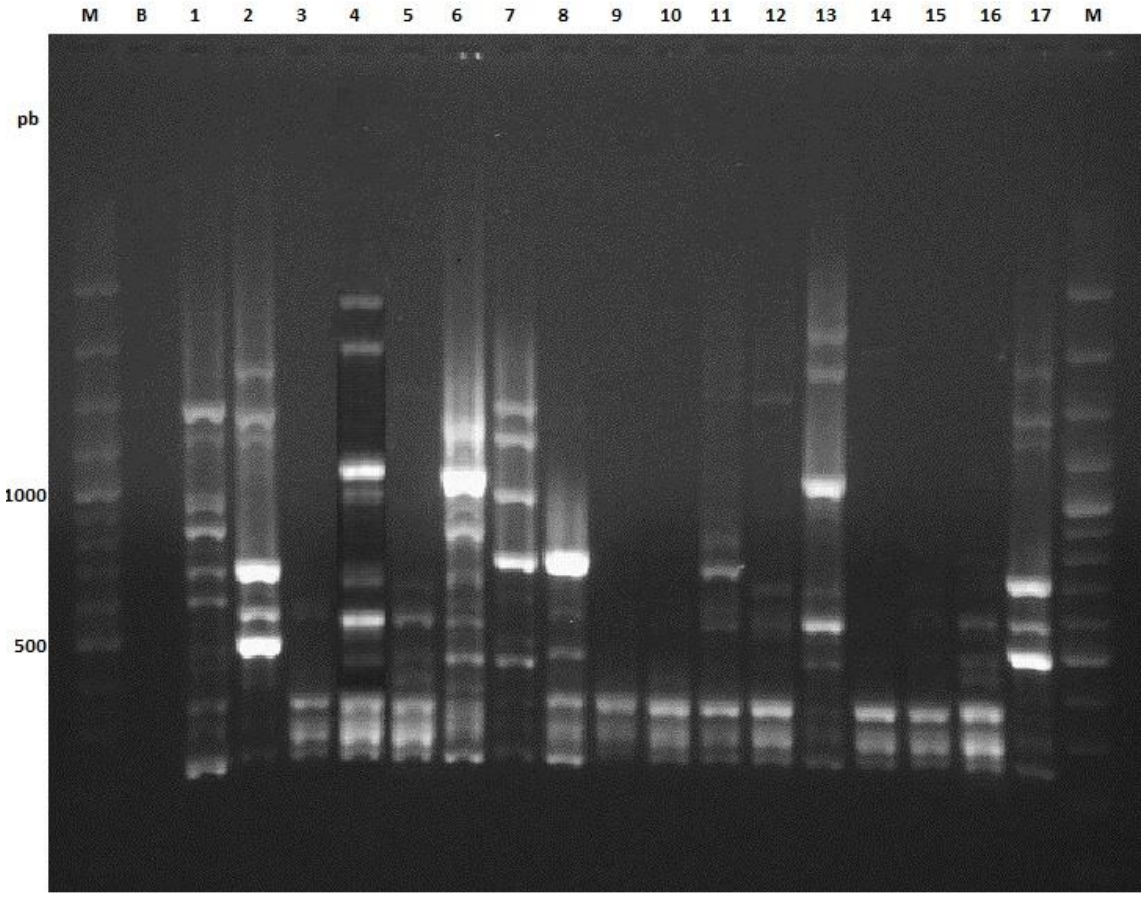

Figura 15 - Eletroforetograma obtido após M13-PCR para as estirpes de *Absidia* spp., *Cunninghamella* spp. e *Rhizopus* spp.
M- Marcador 100 pb plus; B- Branco; 1- *Gongronella butleri* CBS 157.25; 2- *Gongronella lacrispora* CBS 244.62; 3- *Rhizopus oryzae* CCMI 24; 4- *Absidia glauca* CBS 101.08; 5- *Absidia coerulae* CBS 104.08; 6- *Absidia glauca* CCMI 91; 7- *Absidia blakesleeana* CBS 100.28; 8- *Absidia cuneospora* CBS 101.59; 9- *Absidia parricida* CBS 174.67; 10- *Absidia anomala* CBS 125.68; 11- *Rhizopus oryzae* CCMI 1105; 12- *Rhizopus oryzae* CCMI 1104; 13- *Gilbertella persicaria* CBS 403.51; 14- *Rhizopus oryzae* CCMI 900; 15- *Cunninghamella echinulata* CBS 156.28; 16- *Cunninghamella binariae* CBS 481.66; 17- *Gongronella lacrispora* CBS 101757.

Os isolados de *Gongronella* sp. apresentaram uma banda correspondente a cerca de 1500 pb e outra correspondente ao fragmento de 600 pb que também se observaram nas estirpes *G. lacrispora* e *G. butleri*. Apresentaram também um fragmento com dimensões aproximadas a 1100 pb que apenas se observou nas estirpes *Gongronella butleri*. No entanto em todas as estirpes em estudo, visualizaram-se quatro fragmentos com dimensões compreendidas entre os 300 e 500 pb, sendo estas mais intensas nas estirpes *Gongronella* sp. e *G. butleri.*

Os perfis moleculares obtidos das estirpes *Rhizopus oryzae* em estudo apresentaram algumas diferenças. Assim, na estirpe *R. oryzae* CCMI 1105, observou-se a existência de 3 bandas que não foram detetadas na estirpe *R. oryzae* CCMI 1104, uma banda correspondente ao fragmento de dimensão de 2300 pb, outra correspondente a fragmentos de 1200 pb.

Para avaliar o grau de similaridade entre as estirpes em estudo procedeu-se à construção de dendogramas através do *software* Gel Doc XR (BioRad), tendo sido utilizado o coeficiente de similaridade de Pearson (baseado na intensidade das bandas) e o método UPMGA para agrupamento de estirpes. Os dendogramas obtidos após M13-PCR estão apresentados nas Figuras 16 e 17.

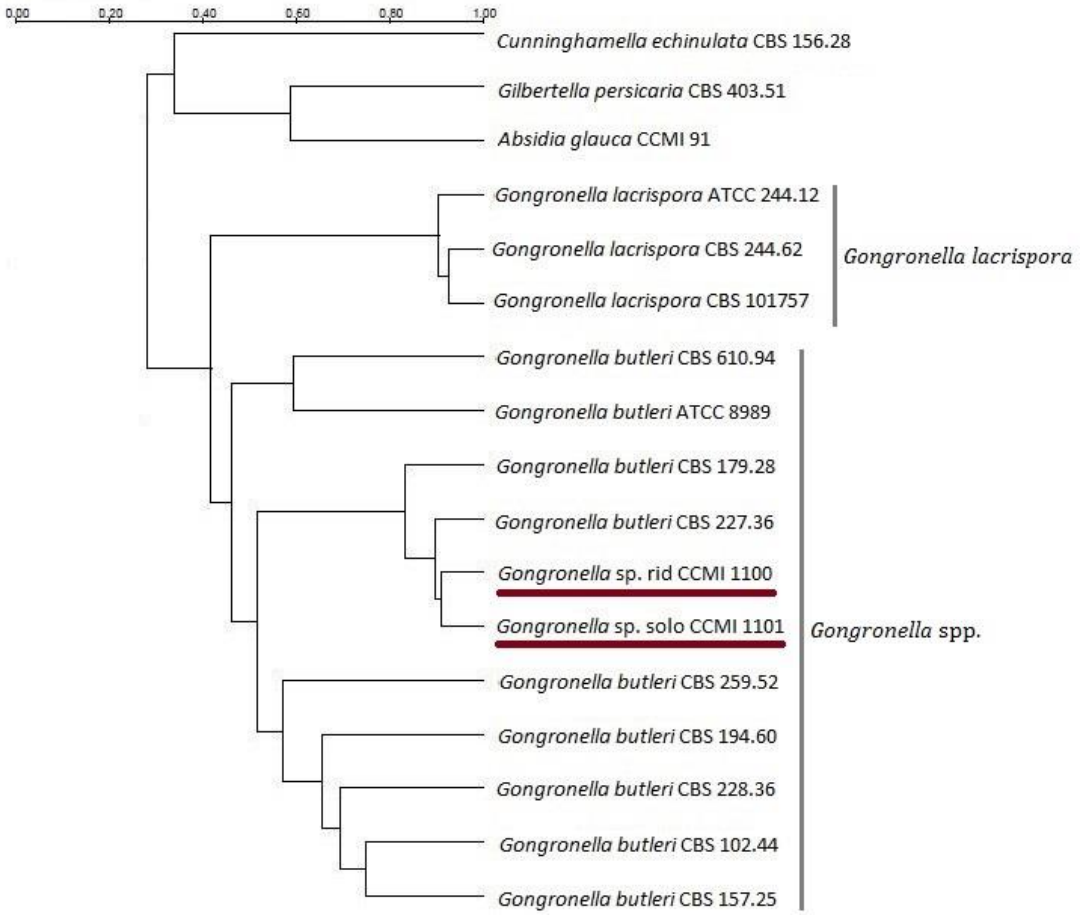

Figura 16 - Dendograma do perfil de eletroforese obtido apos M13-PCR para as estirpes em *Gongronella* spp.

Os resultados obtidos por M13-PCR permitiram obter o dendograma apresentado na Figura 16, o qual apresentou dois *clusters* principais, um que engloba as estirpes dos géneros *Rhizopus, Absidia e Cunninghamella* com 35% de similaridade entre géneros, e outro que engloba as estirpes *Gongronella lacrispora* e *G. butleri* com aproximadamente 45% de similaridade.

Dentro do grupo formado pelas estirpes *Gongronella* spp. observaram-se outros dois *clusters*, um deles entre as estirpes *G. lacrispora* CBS 101757 e *G. lacrispora* CBS 244.62 com um grau de similaridade de 90%, e outro com as restantes estirpes de *Gongronella*, com um grau de similaridade de aproximadamente 50%. que vem apoiar a "reclassificação" da *Circinella lacrimispora*,

Dentro deste último grupo as estirpes *Gongronella* sp. formaram um *cluster* juntamente com duas estirpes de *G. butleri* com um grau de similaridade de cerca de 90%.

O dendograma (Figura 17) mostra dois *clusters* principais, um que engloba a estirpes *Gongronella* spp. e *Cunninghamella* spp. com 35% de similaridade entre géneros, e outro que engloba as estirpes *Rhizopus* spp. *e Absidia* spp. com aproximadamente 50% de similaridade.

Dentro deste último *cluster* observaram-se outros dois, um deles entre as estirpes *Absidia* spp. com um grau de similaridade de 60%, e outro com as estirpes do género *Rhizopus* spp. Dentro deste último grupo as estirpes *Rhizopus oryzae* CCMI 1104 e *R. oryzae* CCMI 1105 apresentaram um grau de similaridade de 80%, dentro do qual apresentaram um grau de similaridade de 70% com a estirpe *R. oryzae* CCMI 24 e um grau de similaridade de 60% com o *R. oryzae* CCMI 900.

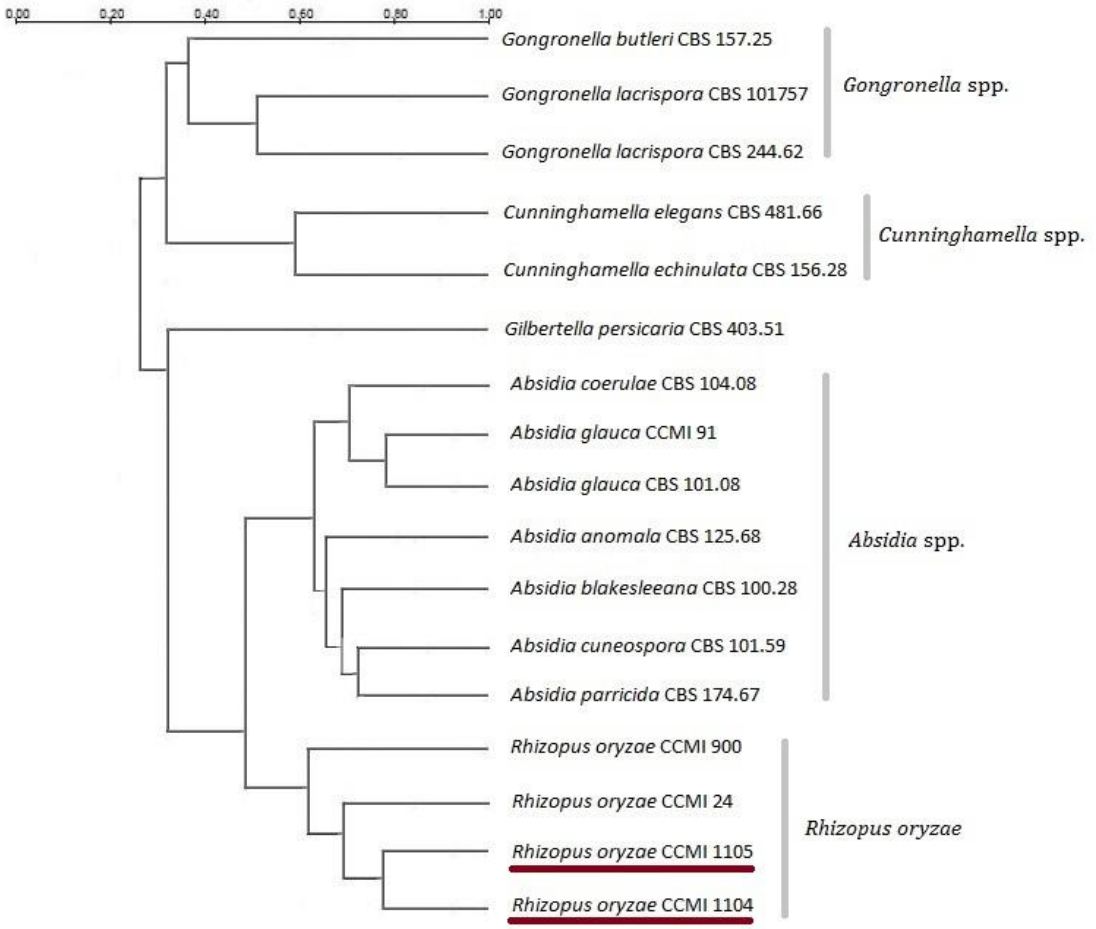

Figura 17 - Dendograma do perfil de eletroforese obtido apos M13-PCR para as estirpes de *Absidia* spp., *Cunninghamella* spp. e *Rhizopus* oryzae.

5.5. MALDI-TOF MS

Os espectros de massa obtidos na faixa de 2000 a 20000 m/z foram alcançados para os 30 isolados a partir da mistura micélio/esporos com quatro dias de crescimento.

Um exemplo, de espetros de massa MALDI-TOF MS dos isolados é apresentado na Figura 18. A Figura 18 apresenta o *fingerprinting* de massa caracteristico das estirpes *Gongronella* spp. na faixa detetavel que se encontra entre 2000 a 9000 m/z.

Os espetros de massa obtidos para as estirpes de Gongronella em estudo, revelaram ligeiras diferenças entre eles, não em relação à intensidade dos picos mas sim, a presença ao ausência destes.

A reprodutibilidade dos espectros não é totalmente alcançada quando analisamos fungos filamentosos por MALDI-TOF MS. Existe sempre uma pequena percentagem de diferenças aquando da comparação dos espectros que pode ser facilmente justificada por varios parâmetros. A preparação das amostras e os fenótipos morfológicos heterogéneos de fungos filamentosos produzem heterogeneidade nos espectros de massa MALDI-TOF, tanto entre diferentes estirpes da mesma espécie como em subculturas da mesma espécie. Estes parâmetros podem ser diminuidos, aumentando o número de espectros de referência de uma determinada espécie incluídos em bases de dados de referência (Normand et al., 2013).

A Figura 19, mostra um dendrograma com base no agrupamento estatístico entre os espectros de MALDI-TOF MS para os 30 isolados em estudo, na faixa entre 2000 a 20000 Da, tendo sido observado a formação de 5 *clusters* distintos. O *cluster* I, que permitiu o agrupamento das estirpes *Rhizopus oryzae*; o *cluster* II que agrupou as estirpes do género *Absidia* e o *cluster* III onde se observou o agrupamento dos fungos *Cunninghamella* spp.

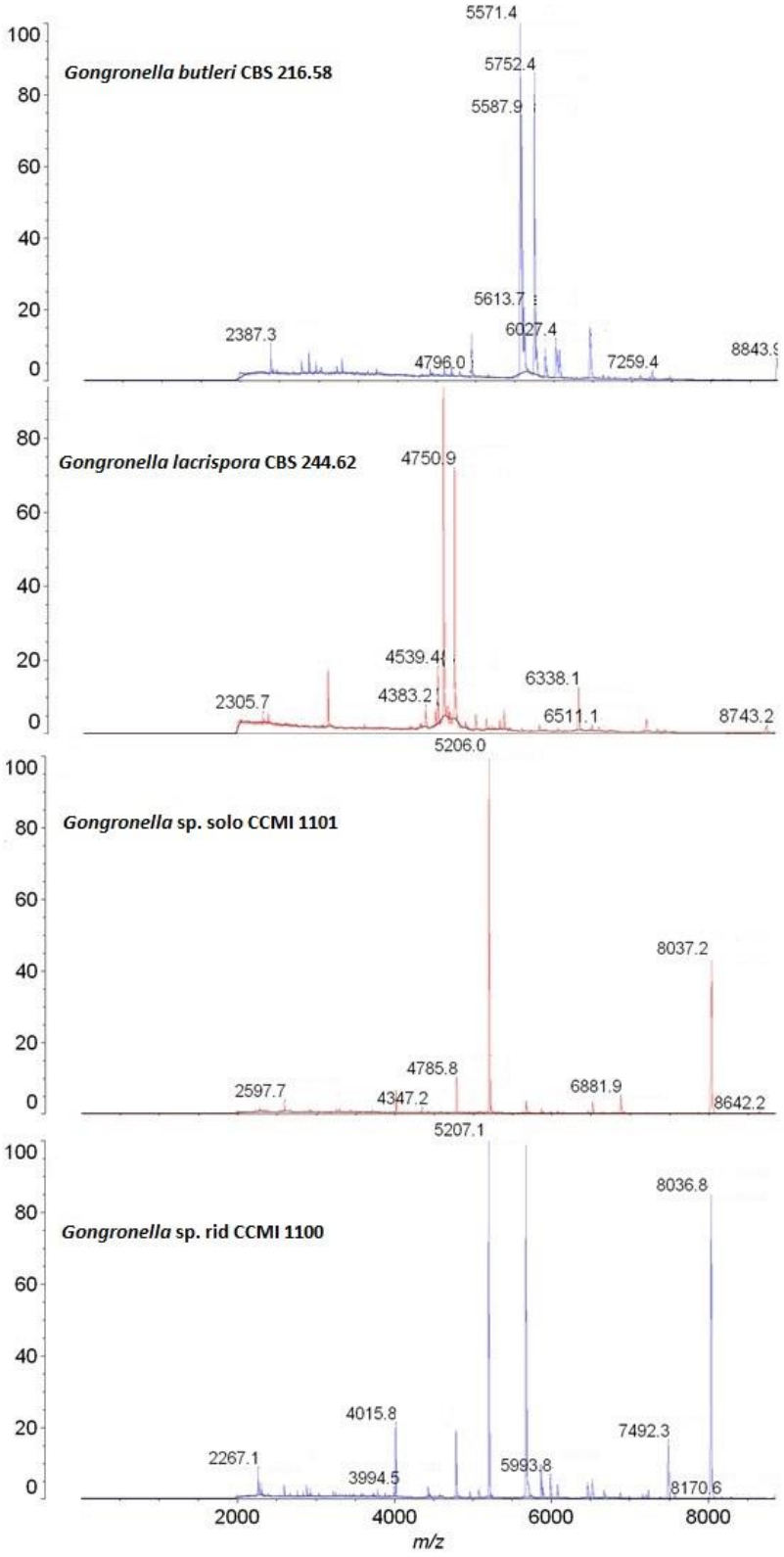

Figura 18 – Espectros de massa representativos de estirpes do género *Gongronella*.

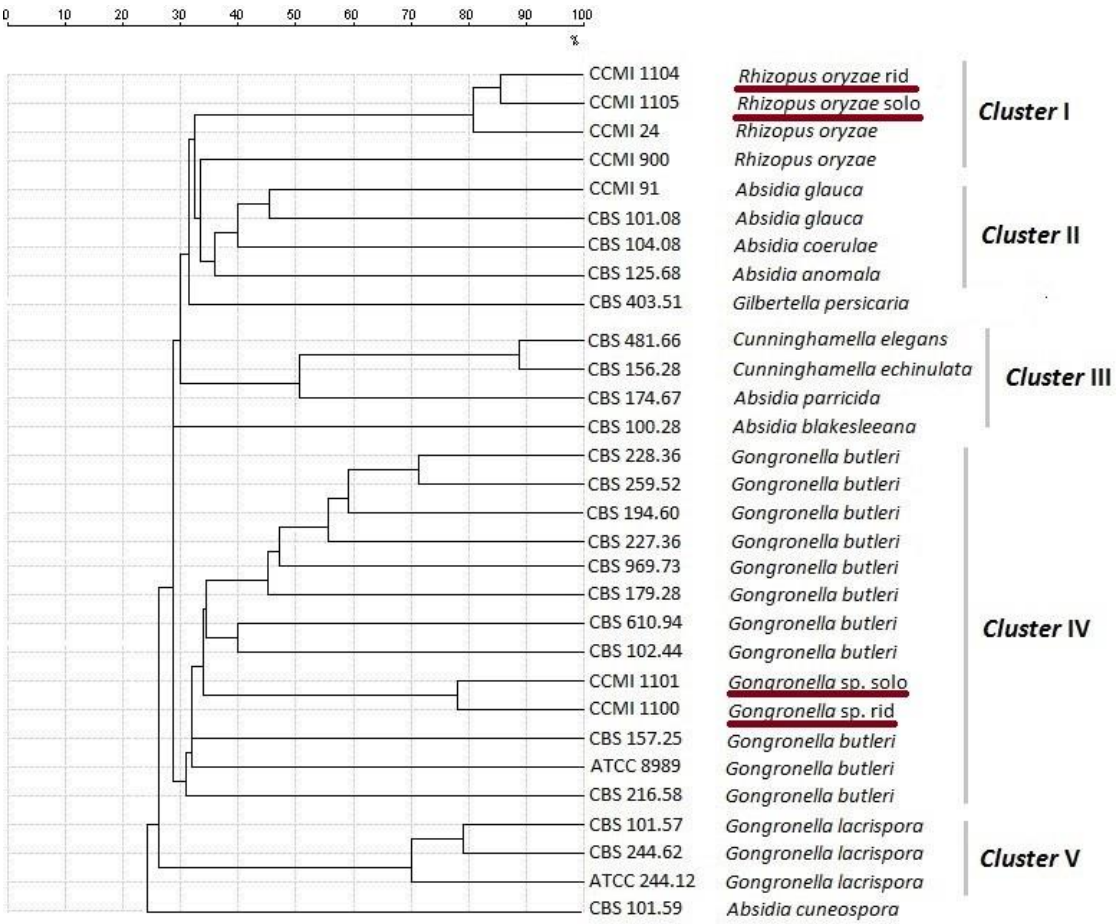

Figura 19 -Dendograma resultante da análise por MALDI-TOF MS dos 30 isolados em estudo.

Por fim, nos *clusters* IV e V observou-se o agrupamento das estirpes *Gongronella butleri*, incluindo as estirpes *Gongronella* sp., com um grau de similaridade de aproximadamente 80% entre elas e o agrupamento da *G. lacrispora* CBS 101757 e *G. lacrispora* CBS 244.62 com um grau de similaridade espetral de 80%. Apesar das estirpes *Gongronella* sp. estarem incorporadas no cluster IV apresentaram um grau de similaridade espetral inferior a 40%, mostrando a grande variabilidade entre espécies.

A posição obtida para a estirpe *Absidia cuneospora*, corrobora os resultados obtidos por Normand et al. (2013), que afirmou, a existência de heterogeneidade dos espetros de massa entre espécies, pois não agrupou com as restantes estirpes *Absidia* spp.

A técnica de MALDI-TOF MS foi aqui demonstrada como sendo sensivel e precisa na discriminação entre as espécies em estudo, podendo ser considerada como uma metodologia adicional para o esquema de identificação polifásica. Além disso, é uma

técnica analitica rápida e barata em termos de trabalho e de consumo, quando comparado com outras técnicas biológicas. No entanto, existe ainda a necessidade de uma base de dados completa dos espetros fúngicos.

6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A metodologia aplicada e apresentada neste estudo permitiu classificar as estirpes estudadas e forneceu novas informações no que diz respeito à taxonomia destes fungos *Mucorales*. Este estudo possibilitou também a reclassificação de quatro estirpes, pela análise filogenética com base no ITS designadamente, *Gongronella lacrispora* CBS 101757, *Rhizopus oryzae* CCMI 24, *Rhizopus oryzae* CCMI 1105 e *Rhizopus oryzae* CCMI 1104. No entanto, não foi possível identificar as estirpes *Gongronella* sp., tratando-se de uma putativa nova espécie deste género.

Como perspetiva futura de aprofundamento deste estudo, sugere-se o aumento da amostragem, tanto em número como em regiões geográficas pesquisadas, de modo a captar a maior variabilidade de caracteres possível.

Pretende-se também completar esta abordagem polifásica com estudos que incluam a análise filogenética de outros genes alvo, designadamente, os genes actina e fator de elongamento 1α, bem como a pesquisa de outros caracteres fenotípicos das estirpes em estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramson, D., Lobaert, G., Clear, R., Sholberg, P., Trelka, R., Rosin, E. (2009). Production of patulin and citrinin by *Penicillium expansum* from British Columbia (Canada) apples. Mycotoxin Research; 25: 85-88.

Abreu, L., Moreira, G., Ferreira, D., Rodrigues, E., Pfenning, L. (2014). Diversity of Clonostachys species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. Fungal Biology; 118(12): 1104-1012.

Bardakci, F. (2001). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Turkish Journal of Biology; 25: 185-196.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Tabelert, P., Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiology; 10(189): 1-9.

Benny, G., Humber, R., Morton, J. (2001). Zygomycota: Zygomycetes. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (eds), The mycota. Vol. VIIA. Systematics and evolution: 113-146. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Branco, S. (2011). Fungal diversity - an overiew. In: Venora G, Grillo O (eds) The dynamical processes of biodiversity - case studies of evolution and spatial distribution. InTech, Rijeka: 221-226.

Castellani, A. (1967). Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 70: 181-184.

Chalupová, J., Raus, M., Sedlárová, M., Sebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. Journal Biotechnology Advances; 32: 230-241.

Dias, N., Santos, C., Portela, M., Lima, N. (2011). Toenail onychomycosis in a Portuguese geriatric population. Mycopathologia et Mycologia Applicata; 172: 55-61.

Ehrenberg, C. G. (1820). De mycetogenesi as Acad. C. L. C. N. C. preaesidem Epistol. Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-CarolinaeGermanicae Naturae Curiosorum; 10: 159-222. (www.mycobank.org)

Erhard, M., von Dohren, H., Jungblut, P. (1997). Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. Nature Biotechnology; 15: 906-909.

Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J., Manfait, M., Sockalingum, G. (2005). Rapid identification of Candida species by FT-IR microspectroscopy. Biochim Biophys Acta; 1724: 239-247.

Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. Journal Microbiol. Methods; 64: 63-77.

Gherbawy, Y., Kesselboth, C., Elhariry, H., Hoffmann, K. (2009). Chapter 11 - Molecular Barcoding of Microscopic Fungi with Emphasis on the Mucoralean Genera Mucor and Rhizopus. In: Y. Gherbawy & K. Voigt (eds.), Molecular Identification of Fungi. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.

Gladkowski, W., Grabarczyk, M., Konopka, M., Wawrzenczyk, C. (2004). Lactones 20. Biohydroxylation of satured bicyclic gamma-lactones with the substituted cyclohexane system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 29: 13-17.

Hebert, P., Ratnasingham, S., deWaard, J. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings Biology Science; 270: 96-99.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J., Cannon, P., et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research III: 509-547.

Hoffmann, K., Discher, S., Voigt, K. (2007). Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant Absidia spp. form a coherent group, *Mycocladiaceae* fam. nov. Mycological Research III: 1169-1183.

Hoffmann, K. & Voigt, K. (2009). *Absidia parricida* plays a dominant role in biotrophic fusion parasitism among mucoralean fungi (Zygomycetes): *Lentamyces*, a new genus for *A. parricida* and *A. zychae*. Plant Biology; 11: 537-554.

Hoffmann, K., Paywlowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., Hoog, G., Benny, G., Kirk, P., Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. Persoonia; 30: 57-76.

Kallow, W., Santos, I., Erhard, M., Serra, R., Venâncio, A., Lima, N. (2006). In: Meyer W, PearceC, editors. Aspergillus ibericus: a new species of section Nigri characterised by MALDI-TOF MS. 8th International Mycological Congress, Cairns, Australia (Proceedings Book). Pianoro (BO). Italy: MEDIMOND. pp 189-193.

Keys, C. J., Sare, D., Sutton, H., Wells, G., Lunt, M., McKenna, T., McDowall, M., Shah, H. (2004). Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. Infection, Genetics and Evolution; 4: 221-242.

Klich M. (2002). Identification of common Aspergillus species. CBS, Utrecht.

Kumar, N. & Gurusubramanian, G (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. Science Vision; 11(3): 116-124.

Kummerle, M., Scherer, S., Seiler, H. (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. Applied Environment Microbiology; 64: 2207-2214.

Lee, D. & Chapman, D. (1986). Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. Bioscience Reports; 6: 235-256.

Liu, X. Y., & Voigt, K. (2009). Chapter 20 - Molecular Characyers of Zygomycetous Fungi. In: Y. Gherbawy & K. Voigt (eds.), Molecular Identification of Fungi. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.

Martin, M., Mengs, G., Allende, J., Fernandez, J., Alonso, R., Ferrer, E. (1998). Characterization of two novel propachlor degradation pathways in two species of soil bacteria. Applied Environment Microbiology; 65: 802-806.

Martins, M., Lima, N., Silvestre, A., Queiroz, M. (2003). Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioacessible reactive azo dyes. Chemosphere; 52: 967-973.

Martins, M. R., Pereira, P., Lima, N., Cruz-Morais, J. (2013). Degradation of Metalaxyl and Folpet by filamentous fungi isolated from portuguese (Alentejo) vineyard soils. Archives of Environmental Contamination and Toxicology; 65: 67-77.

Matruchot, L. (1903). Une Mucorinée purement conidienne. Cunninghamella africana. Annales Mycologici; 1: 45-60. (www.mycobank.org)

Nilsson, R., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. FEMS Microbiology Letters; 296: 97-101.

Normand, A., Cassagne, C., Ranque, S., L'Ollivier, C., Fourquet, P., Roesems, S., Hendrickx, M., Piarroux, R. (2013). Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. BMC Microbiology; 13(76): 1-14.

Petisco, C., Downey, G., Murray, I., Zabalgogeazcoa, I., García-Criado, B., Garccía-Ciudad, A. (2008). Direct classification of related species of fungal endophytes (*Epichloe* spp.) using visible and near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. FEMS Microbiology Letters; 284: 135-141.

Pitcher, D., Saunders, N., Owen, R. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters In Applied Mirobiology; 8(4):151-156.

Ribaldi, M. S. (1952). Sopra un interessante Zigomicete terricolo: Gongronella urceolifera n. gen. et n. sp. Rivista di Biologia; 49(1): 157-166. (www.mycobank.org)

Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, z., Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. International Journal Food Microbiology; 129(2): 187-193.

Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N. (2011). Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. Journal of Applied Microbiology; 111: 877-892.

Ryzhov, V. & Fenselau, C. (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cell. Analytical Chemistry; 73: 746-750.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol.; 4(4): 406-425.

Sarah, E. & Walker, J. (2013). Chapter Fourteen - Sanger Dideoxy Sequencing of DNA. Methods in Enzymology; 529: 171-184.

Sambrook, J., Feitsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Santos, C., Fraga, M., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. Research in Microbiology; 161: 168-175.

Santos, C., Paterson, R., Venâncio, A., Lima, N. (2010). Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of Applied Microbiology; 108: 375-385.

Santos, I., Venâncio, A., Lima, N. (1998). Fungos contaminantes na indústria alimentar. Micoteca da Universidade do Minho, Braga, pp 1-128.

Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. (2012). The nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 109: 6241-6246.

Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O. (2006). Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissue. Journal of Clinical Microbiology; 44: 340-349.

Sedo, O., Sedlacek, I., Zdrahal, Z. (2011). Sample preparation methods for MALDI-MS profilling of bacteria. Mass Spectrometry Reviews; 30: 417-434.

Simões, M., Pereira, L., Santos, C., Lima, N. (2013a). Chapter 5; Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. Management of Microbial Resources in the Environment: 91-118.

Simões, M., Santos, C., Lima, N. (2013b). Structural diversity of *Aspergillus* (section *Nigri*) spores. Microscopy and Microanalysis; 10: 1-8.

Skiada, A., Pagano, L., Groll, A., Zimmerli, S., Dupont, B. (2011). Zygomycoses in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology ECCMM Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. Clinical Microbiology and Infection; 17: 1859-1867.

Soares, C., Rodrigues, P., Perterson, S., Lima, N., Venâncio, A. (2012). Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. Mycologia; 104: 682-697.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol.Biol.Evol.; 30(12):2725-2729.

Tieghem, P. (1878). Troisième mémoire sur les Mucorinées. Annales des Sciences Naturelles Botanique; 4: 312-399. (www.mycobank.org)

Voigt, K. & Wöstemeyer, J. (2001). Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin ans translation elongation factor EF-1α genes. Gene; 270: 113-120.

Walther, G., Pawlowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, J., Dolatabadi, S., Chakrabarti, A., Hoog, G. (2013). DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. Persoonia; 30:11-47.

White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press: 315-322.

Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research; 18: 6531-6535.

Sites consultados:

[1] – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ (consultado a 24 de Outubro de 2014)

8. ANEXOS

Anexo I: Soluções e Meios de Cultura

A - Composição de algumas soluções utilizadas nos métodos de análise molecular:

- **Tampão de Lise, pH 8**

Tris-HCl 50 mM	0,3030 g
NaCl 250 mM	0,7305 g
EDTA 50 mM	0,9305 g
SDS 0.3%	0,15 g
Água ultrapura estéril	50 mL

- **Tampão de extração (TE) pH 8**

Tris 10 mM	0,3029 g
EDTA 1 mM	0,0931 g
Água ultrapura estéril	200 mL

- **Tampão acetato de sódio 3M, pH 5,2**

Acetato de sódio	24,61 g
Ácido Acético glacial	
Água ultrapura estéril	100 mL

- **Solução de TE com RNAse (100 µg/mL)**

Solução stock de RNAse 10 mg/mL	50 µL
Tampão de extração, pH8	10 mL

- **TBE 10X, pH 8**
  Tris 890 mM
  Ácido Bórico 890 mM
  EDTA 0,5 M

- **TBE 1x**
  Diluição de 1:10 da solução 10X com água ultrapura estéril

- **Solução de corante stock (6X)**
  Azul de bromofenol
  Xilenocianol
  Glicerol
  TBE 1X

- **Solução de corante (1X) (para eletroforese)**
  Diluição de 1:6 da solução stock com TBE 1X

B - Composição química dos meios de cultura utilizados neste trabalho:

Meio Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar (Merck)	39 g
Água bidestilada	1 L

Meio Malt Extract Agar (MEA)

Malt Extract Agar (oxoid)	20 g
Bactopeptona	1 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Água bidestilada	1 L

Meio Malt Extract Glucose Yeast Extract Peptone (MGYP)

Malt extract	0,3 g
Glucose	1 g
Yeast Extract	0,3 g
Peptone	0,5 g
ADE	100 mL

Anexo II

Tabela 5 – Quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA das estirpes em estudo.

Fungo	[DNA] ng/µL	A260/A280	A260/A230
Gongronella sp. CCMI 1101	2,8	1,2	0,6
Gongronella sp. CCMI 1100	30,5	2,1	0,2
Gongronella butleri ATCC 8989	260,4	1,5	1,5
Gongronella butleri CBS 227.36	207,3	2,1	1,7
Gongronella butleri CBS 179.28	56,1	1,6	0,2
Gongronella butleri CBS 157.25	132,1	1,4	0,01
Gongronella butleri CBS 228.36	957,7	1,5	1,4
Gongronella butleri CBS 216.58	106,4	1,7	0,2
Gongronella butleri CBS 259.52	82,1	1,6	0,2
Gongronella butleri CBS 194.60	255,8	2,3	2
Gongronella butleri CBS 102.44	223,1	1,7	0,3
Gongronella butleri CBS 610.94	72,4	1,6	0,4
Gongronella butleri CBS 969.73	1046,4	2,1	1,6
Gongronella lacrispora ATCC 244.12	1558,2	2,1	2,2
Gongronella lacrispora CBS 244.62	197,6	1,8	0,2
Circinella lacrimispora CBS 101757	80,4	2,2	2
Circinella simplex CCMI 24	114,4	1,2	0,3
Absidia glauca CBS 101.08	91,8	1,4	0,2
Absidia glauca CCMI 91	107,6	1,4	0,2
Absidia coerulae CBS 104.08	118,2	1,2	0,3
Absidia blakesleeana CBS 100.28	58,1	1,6	0,1
Absidia cuneospora CBS 101.59	115,8	1,5	0,1
Absidia parricida CBS 174.67	210,5	1,6	1,5
Absidia anómala CBS 125.68	82,7	1,5	0,4
Rhizopus stolonifer CCMI 1105	166,1	1,2	1
Rhizopus stolonifer CCMI 1104	175,7	1,3	1,2
Rhizopus stolonifer CBS 403.51	77	1,2	0,1
Rhizopus oryzae CCMI 900	111,4	1,1	0,1
Cunninghamella echinulata CBS 156.28	603,9	2,3	0,3
Cunninghamella elegans CBS 481.66	258,1	1,7	0,3