

CONFIRMAÇÃO MOLECULAR POR SEQUENCIAMENTO DO COGUMELO BRASILEIRO COMERCIALIZADO COMO *Pleurotus ostreatoroseus*

Giovana Tiemi Nunes Pereira¹, Marcela Funaki dos Reis²

¹ Acadêmica do Curso de Biomedicina, UNICESUMAR, Maringá/PR. Bolsista PIBIC/CNPq-UniCesumar. giovanatnp@gmail.com

² Orientadora, Doutora, Professora de Ciências Biológicas e da Saúde. marcelafunaki@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi confirmar a identificação molecular do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* utilizando a técnica de sequenciamento de DNA. A amostra do cogumelo foi obtida a partir do Mercado Municipal de São Paulo por intermédio do Mercado Shinnai de Maringá-PR. A amostra foi encaminhada ao laboratório de Biologia Molecular da UniCesumar para extração de DNA e laboratório de Microbiologia para armazenamento. Foi realizada a extração de DNA seguida de eletroforese para avaliar a qualidade do material obtido. Foram realizadas novas extrações de DNA visando integridade e, em seguida realizada a reação em cadeia da polimerase utilizando os primers ITS1 e ITS2. O amplicon obtido foi visualizado em eletroforese de 2,5% de agarose corado com brometo de etídeo revelando uma banda de cerca de 350 pb. Estas amostras de DNA amplificado serão encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia de Fungos da Universidade Estadual de Maringá para preparo e envio para sequenciamento. Após o retorno dos dados de sequenciamento a amostras será confirmada como *P. ostreatoroseus* utilizando recursos de análise de bioinformática. Espera-se ao final deste estudo contribuir com a popularização desta espécie de cogumelo que além de comestível apresenta propriedades medicinais.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinformática; Bioprospecção; Cogumelos; *Pleurotus ostreatoroseus*.

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 200 espécies de cogumelos são consumidas no mundo como ingrediente de diversas receitas. Segundo Novaes (2007), os cogumelos são considerados alimentos funcionais, fonte de proteínas, aminoácidos essenciais e não essenciais. Sua gordura bruta possui ácidos graxos livres, mono, di e triglicerídeos, esteroides, terpenóides e fosfolípidios. Ainda segundo Novaes (2007), cogumelos da ordem *Agaricales* possuem vitaminas hidrossolúveis como a tiamina, riboflavina e ácido ascórbico, em diferentes quantidades dependendo da espécie, e vitaminas lipossolúveis, principalmente a vitamina D.

Além de suas propriedades nutritivas estudos foram realizados com fungos *Agaricales* para avaliar seus potenciais efeitos antineoplásicos e papel imunomodulador em células de animais geneticamente alteradas para induzir tumor. Também foi considerado o efeito citostático no crescimento tumoral e na proliferação vascular de suporte ao tumor. Ainda não existe um consenso, entretanto a maior parte dos estudos já realizados demonstra efeito benéfico destes cogumelos como tratamento coadjuvante em portadores de câncer através da imunomodulação, redução do crescimento tumoral pelo efeito citostático e na inibição da vascularização tumoral (NOVAES, 2007).

De acordo com Fortes e Novaes (2006) os cogumelos podem modular a carcinogênese em diferentes estágios, principalmente os pertencentes à ordem *Agaricales*. Os pesquisadores sugerem que componentes como os glucanos, ergosterol, lecitinas e alguns aminoácidos como a arginina e glutamina são imunomoduladores. Os glucanos, por exemplo, inibem o crescimento tumoral promovendo a ativação de células *Natural Killer*, linfócitos T e B, células complementares, aumento de macrófagos, monócitos e anticorpos; já a lecitina tem propriedades indutoras de apoptose nas células tumorais, que constitui mecanismo primário contra neoplasias malignas.

O *Pleurotus ostreatoroseus* é uma espécie pertencente ao gênero *Pleurotus*, da ordem *Agaricales*. É um cogumelo nativo da Mata Atlântica e foi identificado pela primeira

vez por Rof Singer (1960). O gênero é conhecido no Brasil como hiratake, caetetuba e shimeji rosa, internacionalmente é chamado de cogumelo ostra, termo oriundo de sua morfologia (REIS, 2014).

Segundo Corrêa (2016) o gênero cosmopolita *Pleurotus* apresenta alto valor nutritivo e propriedades terapêuticas. As propriedades bioativas destas espécies, sua estrutura química e mecanismos de ação ainda são inexplorados e compõem demandas que a ciência busca alcançar, além disso o *P. ostreatoroseus* é um exemplo de cogumelo brasileiro comestível que possui características químicas e bioativas pouco exploradas.

O sequenciamento é uma técnica que permite a identificação precisa dessas espécies. Consiste em um método analítico que demonstra a ordem dos nucleotídeos em um determinado fragmento de DNA. Através desta sequência é possível obter informações relevantes a respeito de sua estrutura, função e relação evolutiva (WATSON et al., 2009).

Considerando a disponibilidade de técnicas moleculares de identificação de espécies e a carência de estudos e informações relativas ao *P. ostreatoroseus*, é de extrema relevância sua caracterização morfológica e molecular, cujo potencial nutritivo e terapêutico podem fomentar novos estudos relacionados à identificação da microbiota do Paraná, ainda pouco explorada, e a bioprospecção de produtos e métodos pertinentes a diversos setores. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi confirmar a identificação molecular do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* utilizando a técnica de sequenciamento de DNA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo quantitativo de caráter experimental que faz parte do projeto de pesquisa docente “Bioprospecção de fungos: identificação molecular, caracterização química e efeitos biológicos”.

A amostra do cogumelo *Pleurotus ostreatoroseus* foi obtida a partir do Mercado Municipal de São Paulo/SP por intermédio do Mercado Shinnai de Maringá/PR. As amostras são comercializadas como produto para consumo alimentício, portanto são disponibilizadas em bandejas de isopor revestidas com plástico filme e identificadas quanto ao nome popular e científico do cogumelo, valores nutricionais, data de coleta e validade, além de informações do produtor. Ao chegar, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Biologia Molecular da UniCesumar para extração de DNA.

A extração de DNA genômico do basidioma do cogumelo foi realizada utilizando a metodologia descrita por Hui-Yeng et al. (2014). Para estimar a concentração da amostra de DNA genômico foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (KANBE et al., 2002). As regiões ITS1 – 5,8S e ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) foram amplificadas via reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3') e ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990).

Os fragmentos obtidos após amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% e serão purificados utilizando o kit de purificação de bandas de DNA de gel de agarose da Ludwig Biotec. Em seguida cada amostra será enviada para uma empresa privada onde será realizado sequenciamento e os resultados obtidos serão editados utilizando ferramentas de bioinformática (GOLIAS et al., 2019).

Após a edição do sequenciamento as sequências nucleotídicas correspondentes as regiões ITS1 - 5,8S e ITS2 do rDNA serão comparadas àquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information Website), utilizando o programa BLAST para pesquisa das espécies. A confirmação da espécie será determinada baseada no melhor valor de similaridade estatística dada pelo alinhamento de sequências nucleotídicas comparadas utilizando o programa Mega (versão 5.1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O cogumelo *P. ostreatoroseus* é uma espécie nativa cultivada e consumida devido às suas propriedades organolépticas, e isso conduziu as pesquisas em busca da determinação de sua composição centesimal e consequente propriedade funcional. O gênero *Pleurotus* é de cogumelos cosmopolitas com propriedades medicinais reconhecidas com componentes de função biológica determinada (REIS, 2014). Assim, os estudos com *P. ostreatoroseus* mostram que este cogumelo apresenta polissacarídeos com potencial funcional, além de substâncias de caráter e função antioxidante (REIS; ROCHA, 2014; CORRÊA et al, 2016, REIS; ROCHA, 2017; REIS et al, 2021) . Neste estudo amostras de *P. ostreatoroseus* comercializadas para fins comestíveis foram utilizadas para confirmação molecular da espécie. Assim, foi realizada a extração de DNA seguida de visualização em gel de eletroforese à 1% corado com brometo de étido. Após a padronização da extração de DNA as melhores amostras foram utilizadas para a realização da PCR. Nesta reação foram utilizados os primers ITS-ITS2 que amplificam uma região do DNA ribossômico do fungo e por ser uma região altamente conservada é considerada como DNA - Barcoding (FAJARNINGSH, 2017). A reação de PCR amplificou um amplicon de cerca de 350pb (Figura 1).



Figura 1. Gel de eletroforese apresentando amplicon da reação de PCR com primers ITS1 e ITS2.

Ladder de 100pb. Canaletas 1: controle negativo, 2-9: amostras de DNA amplificado com cerca de 350pb.

As amostras de DNA amplificadas serão encaminhadas ao laboratório de Biotecnologia de Fungos da Universidade Estadual de Maringá para preparo e envio para sequenciamento em uma empresa privada. As sequências obtidas serão analisadas usando recursos de bioinformática para confirmação da amostra como *P. oestreatoroseus*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a necessidade de identificação e estudo sobre as propriedades dos fungos do gênero *Pleurotus*, mais especificamente da espécie *P. ostreatoroseus*, este estudo poderá expandir e disseminar informações relevantes a respeito deste organismo pouco conhecido. Além disso, a identificação desta espécie e seu depósito em bancos de dados poderá fomentar novas pesquisas com intuito de determinar sua composição química, seus efeitos biológicos e farmacológicos. Através desses conhecimentos seus

ativos podem ser aplicados em diversos setores, como na saúde e meio ambiente, a partir de biotecnologia aplicada a produtos e métodos na área.

REFERÊNCIAS

CORRÊA, Rúbia Carvalho Gomes. Aplicações Biotecnológicas e Nutracêuticas de *Pleurotus* ssp. 2016. 127 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências Agrárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2016. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/1433/1/000225944.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2021.

CORRÊA, R.C.G., et al. Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. **Food Funct.**, v.6, n.7, p. 2155-2164, 2015.

FAJARNINGSH, N. D. Internal Transcribed Spacer (ITS) as Dna Barcoding to Identify Fungal Species: a Review. **Squalen Bull. Of Mar. and Fish Postharvest and Biotechnology**, v.11, n.2, p. 37-44, 2017.

FORTES, R.C.; NOVAES, M.R.C.G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, n.4, p. 363-371, 2006.

GOLIAS, H. et al. *Tibouchina granulosa* (Vell.) Cogn (Melastomataceae) as source of endophytic fungi: isolation, identification, and antiprotozoal activity of metabolites from *Phyllosticta capitalensis*. **BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY**, v. online, p. 1-9, 2019.

HUI-YENG, Y.; SHIN-YEE, F.; NEG-T-HONG, T.; SZU-TING, N.; CHON-SENG, T. DNA Barcode Markers for Two New Species of Tiger Milk Mushroom: *Lignosus tigris* and *L. cameronensis*. **International Journal of Agriculture & Biology**, 16: 841–844, 2014.

KANBE, T.; HORII, T.; ARISHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 29, 973-989, 2002.

REIS, M.F. Determinação da atividade antioxidante de extratos de *Pleurotus ostreatoroseus* Singer e seus efeitos sobre o desenvolvimento de *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. 77f. **Tese** (Doutorado em Biologia Comparada) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

REIS, M.F.R., ROCHA, C.L.M.S.C. Análise citológica do efeito dos extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre os ciclos de desenvolvimento de *Aspergillus (=Emericella) nidulans*, **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.9, n. 1, p.100-107, 2014.

REIS, M. F.; ROCHA, C. L. M. S. C. (2017). Efeito de extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre o desenvolvimento vegetativo de *Aspergillus nidulans*. **SaBios: Revista De Saúde E Biologia**, v.1, n.2.p.42–52, 2016.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **In:** PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.