

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO –  
CAMPUS SÃO ROQUE

Carina Czerencha Genebra

Thais Alves do Amaral

Identificação de fungos basidiomicetos (Fungi,  
Basidiomycota) ocorrentes na Mata da Câmara, São  
Roque – SP e formulação de banco de DNA

São Roque

2014

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO –  
CAMPUS SÃO ROQUE

Carina Czerencha Genebra

Thais Alves do Amaral

Identificação de fungos basidiomicetos (Fungi,  
Basidiomycota) ocorrentes na Mata da Câmara, São  
Roque – SP e formulação de banco de DNA

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Licenciado em  
Ciências Biológicas sob orientação do  
Professor Dr. Fernando Santiago dos  
Santos e Co-orientação do Professor Dr.  
Sandro José Conde.

São Roque

2014

Carina Czerencha Genebra

Thais Alves do Amaral

Identificação de fungos basidiomicetos (Fungi,  
Basidiomycota) ocorrentes na Mata da Câmara, São  
Roque – SP e formulação de banco de DNA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Estado de São Paulo – Campus  
São Roque, para obtenção do título de Licenciado  
em Ciências Biológicas.

Aprovado: / /

**Banca Examinadora**

Prof. Dr:

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr:

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos primeiramente aos nossos pais que trabalharam muito para que pudéssemos cursar o ensino superior, pelo carinho, apoio e o amor pois fez com que não medissem esforços para que chegássemos na conclusão dessa etapa tão importante em nossas vidas.

Agradecemos todos os nossos familiares, que nos momentos de nossa ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente, e pelo amor incondicional.

Agradecemos o nosso orientador Prof<sup>o</sup>. Dr.Fernando Santiago dos Santos que antes de tudo é nosso amigo onde construímos uma linda amizade que abriga o amor, respeito, cumplicidade, felicidade, muito bom humor e às vezes mal humor. Muito obrigada por estar sempre disponível, por compartilhar a sua vasta sabedoria conosco, por estar sempre ao nosso lado e ajudar a resolver todos os problemas que apareciam diariamente quando achávamos que estava tudo caminhando bem.

Obrigada por embarcar nessa fantástica viagem conosco e vibrar por cada passo conquistado.

Agradecemos o nosso co-orientador Prof<sup>o</sup>.Dr. Sandro José Conde pela orientação, apoio, paciência e amizade, ao aceitar nos ajudar nesse desafio.

Nossos sinceros agradecimentos ao Flavio Trevisan, Carlos Pelleschi Taborda, Glauce Mary Gomes Rittner, Lucas dos Santos Dias, Mariana Doprado e toda a equipe do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

O nosso obrigada de coração há todos que estiveram envolvidos no nosso trabalho e que estiveram ao nosso lado para que a chegássemos ao fim dessa longa jornada chamada TCC.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Filograma mostrando os principais grupos de fungos e suas relações filogenéticas .....	11
FIGURA 2 - Cladograma com os oito grupos atualmente reconhecidos no reino Fungi. ....	19
FIGURA 3 - Área de estudo - Mata da Câmara, São Roque, SP, e sua localização no Brasil e na América do Sul .....	25
FIGURA 4 – Eletroforese realizada nas espécies de basidiomicetos selecionados..	32
FIGURA 5 – Família Agaricaceae .....	39
FIGURA 6 – Família Auriculariaceae.....	39
FIGURA 7 – Família Cortinariaceae .....	40
FIGURA 8 – Família Gomphaceae.....	40
FIGURA 9 – Família Helotiaceae .....	41
FIGURA 10 – Família Hydnangiaceae .....	41
FIGURA 11 – Família Inocybaceae .....	41
FIGURA 12 – Família Lycoperdaceae .....	42
FIGURA 13 – Família Marasmiaceae.....	42
FIGURA 14 – Família Mycenaceae .....	43
FIGURA 15 – Família Polyporaceae .....	43
FIGURA 16 – Família Psathyrellaceae.....	44
FIGURA 17 – Família Pyronemataceae .....	44
FIGURA 18 – Família Russulaceae .....	45
FIGURA 19 – Família Sarcoscyphaceae.....	45
FIGURA 20 – Família Strophariaceae.....	46
FIGURA 21 – Gêneros e espécies não determinados .....	46
FIGURA 22 – Gêneros e espécies não determinados .....	47
FIGURA 23 – Gêneros e espécies não determinados .....	47

FIGURA 24 – Gêneros e espécies não determinados .....	48
FIGURA 25 – Gêneros e espécies não determinados .....	48

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Relação de basidiomicetos circunscritos em famílias, gêneros e, quando possível, espécies. ....	30
--	----

## SUMÁRIO

Introdução .....	11
CAPÍTULO 1 – FUNGOS BASIDIOMICETOS .....	13
1.1 Características morfofisiológicas de fungos .....	13
1.2 Tipologia.....	15
1.3 Basidiomicetos .....	16
1.4 Identificação e taxonomia .....	17
CAPÍTULO 2 – EXTRAÇÃO DE DNA .....	20
2.1 Procedimentos de extração.....	20
2.2 Delimitações de grupos biológicos a partir do DNA.....	22
CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	24
3.1 Área de estudo .....	24
3.2 Métodos.....	25
CAPITULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CAPITULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXOS – Registro fotográfico .....	39

## RESUMO

O estudo das espécies e sua filogenia pode ser definido por meio da identificação morfológica e a Biologia Molecular, utilizando o DNA dos seres vivos, e vem sendo paulatinamente mais utilizado devido à filogenética. Em relação aos fungos basidiomicetos (Fungi, Basidiomycota), entretanto, ainda encontram-se poucos estudos relacionados a esta área.

A tarefa de identificação das espécies fúngicas da divisão Basidiomycota é dificultada diante das semelhanças entre as milhares de espécies que compõem este grupo e por não ter nenhum registro de trabalhos descrevendo a biota fúngica da Mata da Câmara local de coleta de dados); desta maneira mostra-se importante ter o registro fotográfico para ser utilizado juntamente às chaves.

Extrair DNA de basidiomicetos é tarefa difícil, uma vez que as membranas das células fúngicas possuem muitas camadas de lipídios e polissacarídeos, que dificultam a criação de banco de DNA.

O trabalho incluiu a coleta das espécies na Mata da Câmara, a identificação dos gêneros e, quando possível, das respectivas espécies, a extração de DNA no Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e a eletroforese em gel de agarose para verificar a qualidade das extrações de DNA.

**Palavras-chave:** fungos, identificação, biologia molecular, protocolo, basidiomycota.

## ABSTRACT

The study of the species and their phylogeny can be defined by morphological and molecular biology, using the DNA of living organisms, and has been gradually more used because of phylogenetic. Regarding basidiomycetes fungi (Fungi, Basidiomycota), however, still are few studies related to this field.

The task of identifying the fungal species of Basidiomycota division is difficult given the similarities between the thousands of species that make up this group and have no record of studies describing the fungal biota of the Forest of the local Chamber of data collection); thus shown to be important to have the photographic record to be used along the keys.

Basidiomycetes extract DNA is a difficult task, since the membranes of yeast cells possess many layers of lipids and polysaccharides, which hinder the creation of DNA bank.

The work included the collection of species in Forest Hall, the identification of genres and, where possible, of the species, DNA extraction in the Fungi Pathogenic dimorphic Laboratory of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, and the electrophoresis agarose gel to check the quality of DNA extractions.

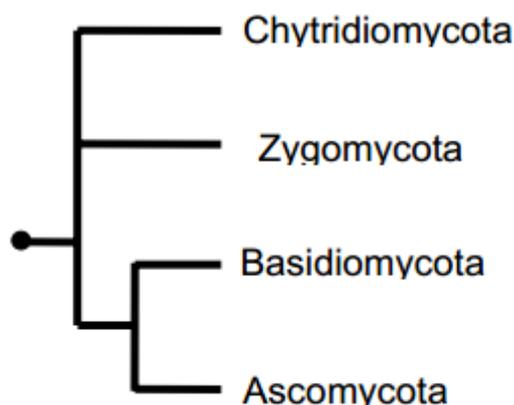
**Keywords:** fungi, identification, molecular biology, protocol, basidiomycota.

## INTRODUÇÃO

O presente estudo foi realizado no Parque Natural Municipal Mata da Câmara (São Roque – SP), integrante de um remanescente de Mata Atlântica distante 60 km de São Paulo – SP. Sabe-se, por meio de consulta à literatura, que aparentemente há poucos estudos das espécies ali presentes, principalmente as fúngicas.

Este Trabalho de Conclusão de Curso tem como escopo principal estudar os cogumelos basidiomicetos (Fungi, Basidiomycota). Entre aproximadamente 22 mil espécies catalogadas até o momento, encontram-se cogumelos comestíveis e venenosos, orelhas-de-pau, bem como dois grupos fitopatogênicos importantes, as ferrugens e os carvões (RAVEN *et al.*, 2007; PETERSEN, 2012).

Durante muito tempo, os fungos foram considerados vegetais e somente a partir de 1969 é que eles passaram a ser classificados em um reino separado: Fungi (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; SIMPSON, 2010). A classificação que é considerada até hoje pelos micologistas foi proposta por Alexopoulos *et al.* (1996, *apud* SILVA; COELHO, 2006) (Fig.1).



**Figura 1.** Filograma mostrando os principais grupos de fungos e suas relações filogenéticas (GUERRA *et al.*, 2011).

Os basidiomicetos possuem um papel preponderante na decomposição de substratos vegetais, constituindo aproximadamente 67% da biomassa viva (não incluindo os animais) do solo nas regiões temperadas (RAVEN *et al.*, 2007).

Sendo o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia São Paulo (IFSP) uma instituição de ensino que se encontra na cidade de São Roque e possui diversificadas linhas de pesquisa, é de grande interesse que haja geração de

conhecimento científico sobre o grupo estudado. Há registrado no Diretório de Grupos de Pesquisa no CNPq, sob liderança do orientador, o grupo “Flora criptogâmica, fungal e fanerogâmica da região de São Roque, SP”, em que se enquadra a linha de pesquisa “Fungos: protocolos de extração de DNA e sistemática” (<http://lattes.cnpq.br/web/dgp>).

O projeto é interdisciplinar e será relevante para as disciplinas de Biotecnologia, Botânica I, Sistemática e Biogeografia e Genética Molecular do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do IFSP.

Inserido na proposta de Inovação Científica e Tecnológica do IFSP, este projeto contribuirá para a geração de informações científicas acerca dos materiais-alvo e a inserção dos alunos de Licenciatura em Ciências Biológicas no meio acadêmico, fomentando a pesquisa e a geração de dados científicos para o crescimento do banco de dados da instituição.

Objetiva-se, com este trabalho de pesquisa, focar as seguintes linhas: A) a identificação dos gêneros e espécies (quando possível), circunscritas em suas famílias e ordens; B) adaptação de protocolos para a extração de DNA de algumas espécies de basidiomicetos presentes na área de estudo, com o intuito de formular um banco de DNA das espécies selecionadas.

Este projeto será de grande importância para futuros estudos sobre basidiomicetos da cidade de São Roque devido à aparente falta de estudos na literatura sobre eles e, também, à dificuldade de extração de DNA desse material.

## CAPÍTULO 1 – FUNGOS BASIDIOMICETOS

Durante muito tempo, os fungos foram considerados vegetais, pois apresentam características semelhantes a eles. A evolução dos estudos sobre os fungos evidenciaram um conjunto de características que permitem sua diferenciação dos vegetais, tais como: não sintetizam clorofila, nem pigmentos fotossintéticos; não possuem celulose na parede celular, exceto alguns fungos aquáticos, e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais, porém não podem ser enquadrados no reino Animalia (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Somente a partir de 1969, os fungos passaram a ser classificados em um reino à parte denominado Fungi. Neste reino estão englobadas oito divisões: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia e Basidiomycota (PETERSEN, 2012). O presente trabalho irá abordar especificamente este último. Na figura 1 estão representados as quatro maiores divisões do reino apenas.

Aproximadamente 99.000 espécies de fungos estão descritas (KIRK *et al.* 2008 *apud* MAIA, 2010), o que representa apenas 6,6% das 1.500.000 estimadas no mundo (HAWKSWORTH 2001, KIRK *et al.* 2001 *apud* MAIA, 2010).

### **1.1 Características morfofisiológicas de fungos**

As células fúngicas são eucarióticas, isto é, possuem núcleo com membrana nuclear (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). São compostas pelas seguintes estruturas:

Parede celular: É uma estrutura rígida que protege a célula de choques osmóticos (possui até oito camadas e mede de 200 a 350 nm). É composta de modo geral, por glucanas, mananas e, em menor quantidade, por quitina, proteínas e lipídeos. As glucanas e as mananas estão combinadas com proteínas, formando as glicoproteínas, manoproteínas e glicomanoproteínas. Estudos citoquímicos demonstram que cada camada possui um polissacarídeo dominante: as camadas mais internas (8ª e 5ª) contêm beta-1-3, beta-1-3-glucanas e mananas, enquanto as mais externas contêm mananas e beta-1-6-glucanas. A primeira e a terceira

camadas são as mais ricas em mananas. As glucanas nas células fúngicas são normalmente polímeros D-glicose, ligados por pontes betaglicosídicas. As mananas, polímeros de manose, representam o material amorfo da parede e são diferenciadas em dois tipos: uma manoproteína não-enzimática, envolvida na arquitetura da parede, e uma manoproteína com características enzimáticas, relacionada com a degradação de macromoléculas. A quitina, um polímero (1,4) de 2- acetamida-2-deoxi-beta-D-glicose é o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados e da parede celular fúngica. A quitina é geralmente encontrada como microfibrilas cristalinas, dentro de uma matriz proteica (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Membrana citoplasmática: Atua como uma barreira semipermeável, no transporte ativo e passivo dos materiais, para dentro e para fora da célula, sendo constituída de uma porção hidrofóbica e de uma porção hidrofílica, apolar e polar, respectivamente. Os principais lipídeos apolares são os triacilgliceróis e os esteróis e os polares são os diacilglicerofosfolinas e diacilgliceroetanolaminas. As membranas das células dos fungos têm em sua composição química esteróis, que não são encontrados nas células bacterianas. O esterol da membrana citoplasmática dos fungos é o ergosterol. A membrana é constituída basicamente por lipídeos e proteínas. As proteínas servem como enzimas, que fornecem à membrana diferentes propriedades funcionais, enquanto os lipídeos dão a membrana sua verdadeira propriedade estrutural (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Núcleo: Contém o genoma fúngico que está agrupado em cromossomos lineares, compostos de dupla fita de DNA arrumados em hélice. Contém também as histonas que são proteínas básicas, associadas ao DNA cromossomal. A membrana nuclear é de natureza lipídica e possui numerosos poros. Dentro do núcleo, encontra-se o nucléolo, um corpúsculo esférico contendo DNA, RNA e proteínas. Este corpúsculo é o sitio de produção do RNA ribossomal (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Ribossomos: São os sítios da síntese proteica, compostos de RNA e proteína e ocorrem dentro do citoplasma da célula. São formados por duas subunidades, e a partícula ribossomal (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Mitocôndria: Sítio de fosforilação oxidativa, composta de membranas de fosfolipídeos. Possui membrana interna achatada e contém seu DNA e ribossomos próprios (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Retículo Endoplasmático: É uma membrana em forma de rede que se encontra distribuída por toda a célula fúngica. Está ligada à membrana nuclear, mas não à membrana citoplasmática. Os ribossomos podem estar aderidos ao retículo endoplasmático (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Aparelho de Golgi: Essa estrutura é uma agregação interna de membranas e está envolvida no armazenamento de substâncias que serão desprezadas pela célula fúngica. Os vacúolos estão relacionados com o armazenamento de substâncias de reserva da célula, tais como glicogênio e lipídeos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

## **1.2 Tipologia**

Os fungos podem se desenvolver em meios de cultivo formando colônias leveduriformes e filamentosas.

As colônias leveduriformes são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas.

As colônias filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas, com os mais variados tipos de pigmentação; são constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo — as hifas. As hifas podem ser não-septadas que são conhecidas como cenocíticas ou septadas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; LAESSOE, 2013).

Os propágulos ou órgãos de disseminação dos fungos são classificados, segundo sua origem, em externos e internos, sexuados e assexuados. Embora o micélio vegetativo não tenha especificamente funções de reprodução, alguns fragmentos de hifas podem se desprender do micélio vegetativo e cumprir funções de propagação, uma vez que as células fúngicas são autônomas.

A maioria dos fungos são aeróbios obrigatórios. No entanto, certas leveduras fermentadoras, aeróbias facultativas, se desenvolvem em ambientes com pouco oxigênio ou mesmo na ausência deste elemento (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os fungos são organismos heterotróficos, produzem enzimas como lípases, invertases, lactases, proteinases, amilases, que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável através de mecanismos de transporte ativo e passivo. Alguns substratos podem induzir a formação de enzimas degradativas; há fungos que hidrolisam substâncias orgânicas, como quitina, osso, couro, inclusive materiais plásticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os fungos, como todos os seres vivos, necessitam de água para o seu desenvolvimento. Alguns são halofílicos, crescendo em ambiente com elevada concentração de sal (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A temperatura de crescimento abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os fungos possuem importância econômica, médica, e desempenham papel de decompositores na natureza, e os decompositores são fundamentais na manutenção do equilíbrio natural dos ecossistemas.

### **1.3 Basidiomicetos**

A divisão Basidiomycota compreende os fungos que formam corpos de frutificação, juntamente com os Ascomycota, conhecidos como cogumelos (PETERSEN, 2012). Apresentam hifas septadas e são caracterizados pela produção de esporos sexuais externos, os basidiocarpos, típicos para cada espécie (BONONI *et al.*, 1999).

Em geral, os basidiomicetos possuem um micélio bem desenvolvido, formado por hifas septadas e os septos são perfurados. Em muitas espécies, o poro do septo tem uma margem inflada ou em forma de barril chamada doliporo. Qualquer fungo com septo dolipórico pertence aos Basidiomycota. De ambos os lados do poro há capas membranosas chamadas parentossomos (RAVEN *et al.*, 2007).

Via de regra, a plasmogamia efetua-se muito cedo no desenvolvimento do micélio, seja através da fusão de duas hifas haploides geneticamente diversas, seja pela fusão de uma hifa haploide com um esporo. A hifa resultante é dicariótica e mantém-se dessa forma por muito tempo. Cresce por um processo denominado de divisão celular conjugada, no qual há a formação de *clamp connections*, também chamadas de fíbulas ou ansas. Estas são espécies de ganchos que auxiliam na distribuição, nas duas células filhas, dos quatro núcleos produzidos por divisão

mitótica dos dois núcleos da dicariófase. Muitas vezes, persiste uma dilatação na altura dos septos que dividem as células-filhas, motivo pelo qual o micélio, que então recebe o nome de micélio fibulado, torna-se facilmente reconhecível como micélio típico dos basidiomicetos (RAVEN *et al.*, 2007).

Em determinadas condições, ainda não bem conhecidas, o micélio dicariótico passa a produzir basídios, nos quais ocorre a cariogamia. Segue-se a meiose, com produção de quatro núcleos, que migram para protuberâncias desenvolvidas no ápice do basídio. Tais protuberâncias são sustentadas por pequenos pedículos, os esterigmas. Após a formação dos quatro esporos, estes são eliminados (RAVEN *et al.*, 2007).

A reprodução do micélio vegetativo, por esporos dos mais variados tipos, pode realizar-se tanto no estágio monocariótico como no estágio dicariótico (RAVEN *et al.*, 2007).

Os fungos são considerados biorreguladores, e possuem grande importância na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, pois os mesmos têm realizado um importante papel na ciclagem de nutrientes. Esses organismos tem grande importância no ciclo do carbono e de outros elementos, como fósforo e nitrogênio, além de realizar a ciclagem de matéria orgânica (MUZZI *et al.*, 2013).

Altamente ricos em proteínas, sais minerais, ferro, vitaminas do complexo B, cálcio, fibras e outros elementos essenciais à saúde, os basidiomicetos comestíveis, dentre os quais se destacam os cogumelos, vêm conquistando seu espaço na indústria alimentícia. No Brasil, espécies como *Agaricus bisporus* (Champignon), *Pleurotus ostreatus* (Hiratake), *Agaricus blazei murril* (Himematsutake), *Lentinus edodes* (Shiitake), e *Pleurotus* ssp (Shimeji), são consideradas iguarias e vêm sendo amplamente cultivadas (MUZZI *et al.*, 2013).

#### **1.4 Identificação e taxonomia**

A identificação de fungos sempre foi baseada em sua morfologia, tanto macro como microscopicamente. Como eles habitam os mais variados substratos, apresentam, portanto, uma sucessão formidável de tipos morfológicos, dos mais simples aos mais complexos (PAULA, 2014). Esse tipo de identificação requer experiência por parte do pesquisador, principalmente devido ao fato de que as características dos fungos em desenvolvimento podem mudar consideravelmente

dependendo do meio e das condições a que estão expostos. As características macroscópicas e microscópicas podem ser muito semelhantes entre as espécies, podendo levar a resultados errôneos de identificação. (FISHER; DOTT, 2002 *apud* LUIZ, 2010).

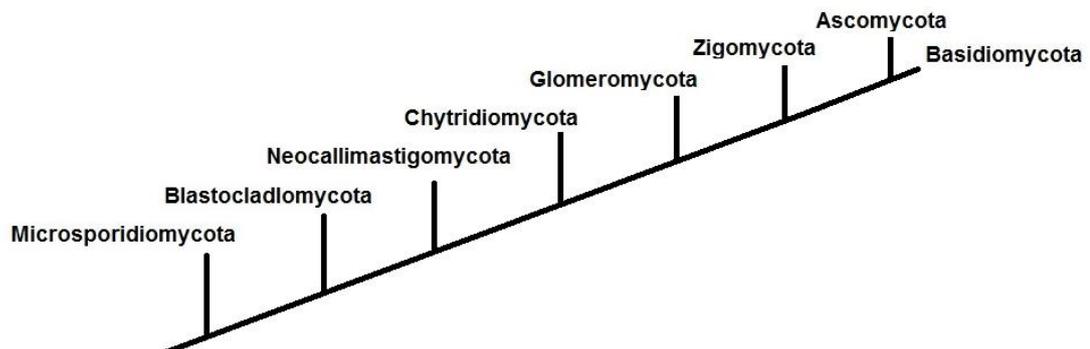
Atualmente, técnicas moleculares têm ajudado os cientistas a confirmar hipóteses de classificação baseadas em morfologia. A aplicação dessas técnicas para a identificação de fungos filamentosos é cada vez mais acessível e visa, principalmente, à análise do gene que codifica para o DNA ribossomal. Nesta região, a sequência de interesse corresponde aos Espaçadores Internos Transcritos (ITS), devido ao seu alto grau de variabilidade entre espécies e, em alguns casos, entre cepas de mesma espécie (ANDERSON; PARKIN, 2007 *apud* LUIZ, 2010).

Os métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), sequenciamento genético, entre outros, são utilizados nos estudos de identificação (GUIMARAES *et al.*, 2006; GODET; MUNAUT, 2009 *apud* LUIZ, 2010).

O uso de técnicas moleculares que exploram as variações na sequência de nucleotídeos no gene que codifica o RNA ribossomal e os espaços intergênicos, fez com que ocorresse, na última década, progresso no estudo da ecologia de fungos (PINHEIRO, 2004; ANDERSON; PARKIN, 2007 *apud* LUIZ, 2010).

Através desses estudos moleculares admite-se que o Reino Fungi contenha pelo menos oito divisões distintas, como citado anteriormente (Fig.2).

Basidiomycota é dividido em três classes: Basidiomycetes, Teliomycetes e Ustilagomycetes. Os Basidiomycetes incluem todos os fungos que produzem basidioma, como os cogumelos e as orelhas-de-pau. Os Teliomycetes incluem as ferrugens e os Ustilagomycetes são os carvões que não formam basidioma. Em vez disso esses fungos produzem esporos em aglomerados denominados soros (RAVEN *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Cladograma com os oito grupos atualmente reconhecidos no reino Fungi (PETERSEN, 2013, traduzido e adaptado).

Uma das mais importantes bases de dados para a classificação através de dados moleculares de fungos é o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), do National Center for Biotechnology Information (NCBI) em colaboração com laboratórios internacionais que reúne sequências de mais de 100.000 organismos distintos. Existem também outras bases de dados que fornecem informações relativas às sequências de microrganismos, como o Index Fungorum ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)), o MycoBank ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)), entre outras (HIBBETT *et al.*, 2007 *apud* LUIZ, 2010).

## CAPÍTULO 2 – EXTRAÇÃO DE DNA

Muito antes da estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico) ser entendida, já se sabia que as características hereditárias e os genes que as determinam estavam associados aos cromossomos. Por meio de análises bioquímicas descobriu-se que os cromossomos continham DNA e proteínas. O DNA é uma molécula que consiste em duas longas cadeias polinucleotídicas (fitas de DNA), e hoje em dia é compreendido como sendo o material genético fundamental para o processamento biológico. Cada cadeia de DNA é composta de quatro tipos de subunidades de nucleotídeos e as duas cadeias são unidas por ligações de hidrogênio entre as bases dos nucleotídeos, essa molécula ainda possui uma estrutura que se torce na dupla-hélice e possuem polaridade antiparalela em suas fitas (ALBERTS *et al.*, 2011).

A informação hereditária de todos os organismos vivos, com exceção de alguns vírus, está presente nas moléculas de DNA. Estas consistem de duas cadeias complementares, cada uma formada por quatro tipos de nucleotídeos: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). (WATSON, 1992; GRIFFITHS, 2000 *apud* KIIHL, 2005).

Os organismos diferem uns dos outros porque suas moléculas de DNA possuem diferentes sequências nucleotídicas, e conseqüentemente, diferentes mensagens biológicas (ALBERTS *et al.*, 2011).

### **2.1 Procedimentos de extração**

As extrações de DNA puro e de boa qualidade são extremamente necessárias para a realização de estudos moleculares, pois se as preparações de DNA não produzirem amostras puras suficientes podem-se causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Existem várias metodologias disponíveis para o isolamento de DNA genômico, mas na prática, esses protocolos são empíricos em função da variabilidade existente na composição do tecido utilizado. Os métodos convencionais simples de extração de DNA não são necessariamente reproduzíveis para todas as espécies, sendo necessárias adaptações e modificações (ARAS *et al.*, 2003 *apud* CHIARI; VALLE; RESENDE, 2009).

Os métodos atuais de extração de DNA de algumas espécies de fungos são demorados e exigem substâncias tóxicas ou são baseados em tecnologias caras (MULLER *et al.*, 1998; FAGGI *et al.*, 2005.; BORMAN *et al.*, 2006.; CHENG E JIANG, 2006 *apud* MANJUNATHAN; KUMAR; KAVIYARASAN, 2011).

Atualmente, o método de extração de DNA mais utilizado para diferentes espécies vegetais é baseado no uso do detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (ROMANO & BRASILEIRO, 1999; MERCADO *et al.*, 1999; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; VASCONCELOS, 1995; DOYLE *et al.*, 1987 *apud* MAZZA; BITTENCOURT, 2000). Esse detergente solubiliza as membranas celulares e, dependendo da concentração de NaCl no tampão, forma um complexo com o DNA, podendo, portanto, ser utilizado para precipitá-lo seletivamente nos casos de difícil separação (KIDWELL & OSBORN, 1992 *apud* MAZZA; BITTENCOURT, 2000).

Segundo Romano e Brasileiro (1999), alguns passos são importantes na obtenção de DNA de boa qualidade e devem ser atendidas independentemente do método utilizado, como por exemplo, as paredes celulares devem ser rompidas com o objetivo de liberar os constituintes celulares. Essa etapa é realizada geralmente pelo congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido e posterior quebra mecânica, com o auxílio de um pistilo e de um almofariz.

As membranas celulares devem ser rompidas para liberação do DNA. Essa etapa é realizada pela ação de um detergente como SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB. Deve-se, também, evitar a ação de DNAses, que podem degradar o DNA. Com esse propósito, os tampões de extração possuem pH por volta de 8,0, enquanto o pH ótimo para ação de DNAses endógenas fica por volta de 7,0. Outro expediente empregado é a adição de EDTA (ácido etileno diamono tetracético) no tampão de extração. O EDTA é uma substância quelante de cátions divalentes, como  $Mg^{+2}$  e  $Ca^{+2}$  e, portanto, inibe a ação de DNAses, que usam esses metais como cofatores (SAMBROOK *et al.*, 1989 *apud* ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Os ácidos nucléicos devem ser separados das proteínas. Para tanto, realiza-se de uma a várias extrações com fenol e/ou clorofórmio, que desnaturam as proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucléicos.

Os ácidos nucléicos devem ser separados de polissacarídeos. Esses inibem a ação de enzimas de restrição (SHIODA & MARAKAMI-MUOFUSHI, 1987) e tornam

a amostra de DNA excessivamente viscosa, interferindo na migração do DNA em corridas eletroforéticas. O detergente CTAB é utilizado com essa finalidade, já que polissacarídeos e ácidos nucleicos possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Depois de realizada a extração, é feita a eletroforese em gel de agarose 1% para identificar se naquela amostra há DNA. Essa técnica separa os fragmentos com base no seu comprimento. A mistura de fragmentos de DNA é aplicada em uma das extremidades de um bloco de gel de agarose. Uma voltagem é então aplicada através do bloco de gel. Como o DNA tem carga negativa, os fragmentos migram em direção do eletrodo positivo; os fragmentos maiores migram mais lentamente porque o seu progresso é mais impedido pela matriz de agarose. Após um tempo, os fragmentos de DNA ficam espalhados ao longo do gel de acordo com o tamanho uma escada de bandas discretas, cada uma composta de uma coleção de moléculas de DNA de comprimentos idênticos.

As bandas de DNA em gel de agarose são invisíveis, a não ser que o DNA seja marcado ou corado de alguma maneira. Um método de detecção é o uso de um corante que fluoresce sob luz ultravioleta quando está ligado ao DNA (ALBERTS *et al.*, 2011).

## **2.2 Delimitações de grupos biológicos a partir do DNA**

O conhecimento da evolução das espécies e a relação entre as espécies têm sido de considerável valor na conservação e utilização dos recursos genéticos. Com o aprimoramento e facilidade das técnicas moleculares, estas têm sido muito utilizadas nas análises filogenéticas (BUSO, 2005).

Durante os últimos dez anos, um grande progresso ocorreu no estudo da evolução no nível molecular devido ao grande avanço no desenvolvimento de técnicas bioquímicas para o estudo do DNA, como a reação em cadeia de polimerase e o sequenciamento automático de ácidos nucleicos (WATSON, 1992 *apud* KIIHL, 2005). Esta metodologia bioquímica tem sido utilizada recentemente em estudos de grande escala que envolvem o conhecimento do genoma completo de diferentes organismos, iniciando a era genômica da biologia molecular (GIBSON; MUSE, 2004 *apud* KIIHL, 2005).

Análise genética é possível em qualquer organismo. Por esta razão, conceitos e enfoques experimentais de genética populacional (estudo de diferenças genéticas

naturais entre organismos) têm atraído quase todas as áreas da biologia moderna (HARTL; CLARK, 1997; NAGYLAKI, 1992 *apud* KIIHL, 2005).

Dados moleculares, particularmente sequências de DNA e aminoácidos, contribuem para estudos evolucionários juntamente com dados morfológicos e fisiológicos. Primeiramente, sequências de DNA e proteínas são entidades transmitidas estritamente de maneira hereditária. Isto pode não ser verdade para muitos aspectos morfológicos que podem ser influenciados por fatores ambientais (KIIHL, 2005).

O isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade constituem passo-chave na análise genética de populações, através de fragmentos de DNA (KIDWELL & OSBORN, 1992 *apud* MAZZA; BITTENCOURT, 2000), ou seja, o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas (MILACH, 1998 *apud* MAZZA; BITTENCOURT, 2000) e ser passível de amplificação. Porém, problemas no isolamento e purificação do DNA podem acontecer, devido ao co-isolamento de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários (MERCADO *et al.*, 1999; ROMANO & BRASILEIRO, 1999; KIDWELL & OSBORN, 1992 *apud* MAZZA; BITTENCOURT, 2000).

Alguns métodos dão rendimentos baixos de DNA, devido às paredes celulares serem dificilmente lisadas (MULLER *et al.*, 1998 *apud* MANJUNATHAN; KUMAR; KAVIYARASAN, 2011). O grande desafio para o isolamento de DNA de boa qualidade e a quantidade de fungos está na quebra da rígida parede celular, uma vez que são resistentes aos procedimentos de extração de DNA tradicional (FREDRICKS *et al.*, 2005). Nucleases fúngicas possuem muitos polissacarídeos que aumentam as dificuldades no isolamento de DNA a partir de fungos filamentosos (ZHANG *et al.*, 1996, MULLER *et al.*, 1998 *apud* MANJUNATHAN; KUMAR; KAVIYARASAN, 2011). Todos os métodos têm em comum a utilização de detergentes tais como SDS para a lise da parede celular, e isso muitas vezes inibe mais manipulações de purificação. Como uma alternativa para a lise por SDS é o uso de produtos químicos tóxicos, por exemplo, o fenol (CHENG E JIANG, 2006 *apud* MANJUNATHAN; KUMAR; KAVIYARASAN, 2011). De acordo com Fredricks *et al.* (2005), nenhum método de extração disponível atualmente é ideal para todos os fungos (MANJUNATHAN; KUMAR; KAVIYARASAN, 2011).

## CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O trabalho foi desenvolvido na cidade de São Roque, no Parque “Mata da Câmara”, e teve início no mês de Janeiro de 2014, encerrando-se em novembro do mesmo ano.

Nos meses de janeiro, fevereiro e março iniciou-se o trabalho com leituras pertinentes ao tema desenvolvido. Após a etapa inicial de levantamento bibliográfico, as coletas, o armazenamento e os registros de basidiomicetos foram realizados a partir do mês de abril, juntamente com as análises laboratoriais para extração de DNA.

### **3.1 Área de estudo**

O estudo foi realizado no Parque Natural Municipal Mata da Câmara, São Roque, SP, Brasil, área remanescente de Mata Atlântica, (23°31'26 S e 47°06'45 W), que é conhecido como “Mata da Câmara”. O parque possui 128 ha, e há cerca de 100 anos é tido como área de conservação (Fig.3). Entretanto apenas em 1999 transformou-se em Parque Natural Municipal de São Roque (Lei Municipal 2.499, de 19/03/1999).

O clima da região é Cfb (classificação de Köppen *apud* CALVANESE; PEREIRA, 2013), com temperatura média de 18° C e precipitação anual de 1.100 a 1.400 mm (SETZER, 1966 *apud* CALVANESE; PEREIRA, 2013) e a vegetação é classificada como Floresta Estacional Semidecidual. (RIZZINI, 1979; BRASIL, 1992 *apud* CALVANESE; PEREIRA, 2013). O relevo é do tipo montanhoso, com altitudes variando de 850 a 1.025 m (PONÇANO *et al.*, 1981 *apud* CALVANESE; PEREIRA, 2013). O principal tipo de solo da região é argiloso (EMBRAPA, 1999 *apud* CALVANESE; PEREIRA, 2013), sendo esta reserva circundada por pastos, plantações comerciais, condomínios residenciais e estradas.



**Figura 3** - Área de estudo - Mata da Câmara, São Roque, SP, e sua localização no Brasil e na América do Sul (CALVANESE; PEREIRA, 2013).

### **3.2 Métodos**

Os seguintes procedimentos foram empregados:

- Coleta em borda de mata: Foram utilizados, nesta etapa, os seguintes equipamentos: pinças, pá de pequeno porte com bico, potes de vidro e sacos feitos com jornal. Para a retirada das amostras de seu ambiente natural, utilizou-se a pá e a pinça para não danificar as amostras e, em seguida, foram inseridas no saco de jornal individualmente ou em potes de vidro;
- Registro fotográfico e identificação: Esta etapa foi necessária, pois algumas espécies de basidiomicetos começam a se degradar depois de minutos de sua retirada do habitat natural. O registro proporcionou a possibilidade de identificação das amostras, com o uso de chaves de identificação variadas (impressas e/ou on-line), entre as quais Mycokey, MushroomExpert, Laessoe (2013), Petersen (2014) e Bononi *et al.* (1999);
- Armazenamento em frascos: O armazenamento teve início com a esterilização dos frascos. Não há um modelo de frasco específico a ser utilizado; a única exigência foi que cada amostra fosse armazenada individualmente para que não houvesse contaminação entre elas.

Para conservação das amostras, foram testados quatro métodos, sendo escolhido o que obteve sucesso na conservação e que não interferiu no momento da extração. Os métodos testados foram os seguintes:

- frascos contendo álcool em gel 70° GL;

- frascos contendo glicerina P.A.;
- óleo mineral;
- frascos submetidos a congelamento (entre -1°C e -4°C).
- Extração de DNA: Foram realizados testes de adaptação de protocolos de extração de DNA. Em um primeiro momento, foi utilizado o protocolo de Dias *et al.* (2012), no laboratório Fungos Dimórficos Patogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (essa parceria foi necessária porque não havia no campus São Roque, quando iniciado o trabalho, equipamentos e reagentes para a extração), o qual é coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, realizando a eletroforese em gel de agarose 1% logo após.

Em seguida, realizou-se a extração de basidiomicetos utilizando o kit PrepMan Ultra do fabricante Life e depois, a eletroforese com gel de agarose a 1%.

Realizou-se, então, a extração utilizando o protocolo segundo Jacobs Jr e Hatfull (2000), porém com adaptações, e logo após se realizou a eletroforese em gel de agarose 1%.

Primeiramente, os basidiomicetos foram conservados por congelamento em freezer comum, com temperaturas entre -1°C e -4°C; posteriormente, a extração foi realizada de acordo com o modelo de protocolo utilizado.

Segundo o protocolo de Dias *et al.* (2012), a extração de DNA foi realizada conforme descrita por Kennedy *et al.* (2008), com algumas modificações. Aproximadamente 0,5 g de massa fúngica, retirada das lamelas e haste, foram maceradas com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para um microtubo Eppendorf de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 1,7 mL de tampão de extração (EDTA 100 mM, Tris 100 mM, NaCl 1,5 M, SDS a 1%, 2% de CTAB) e a mistura foi incubada durante 20 minutos a 65°C (invertendo o microtubo a cada 5 min) antes da centrifugação por 20 minutos a 9,3 G. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo microtubo. Um volume igual de álcool de fenol-clorofórmio-isoamílico (25: 24: 1) foi adicionado, e após a homogeneização do conteúdo do tubo foi centrifugado a 9,3 G durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol (100%) e 0,1 volume de acetato de sódio 3M e o conteúdo misturado invertendo suavemente o microtubo 10 vezes. Após o armazenamento durante a noite a -20°C, a amostra foi centrifugada durante 10 minutos a 9,3 G e o sedimento resultante foi lavado duas vezes com etanol a 70%.

O sedimento foi seco, ressuspensão em 200 µL de água MilliQ e analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE (40 mM de base Tris, 20 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA) a 100 V durante aproximadamente 30 minutos e utilizou-se o corante Sybr Safe.

Para realizar a extração com o kit PrepMan Ultra do fabricante Life, utilizou-se 0,5 g de massa fúngica, retirada das lamelas e haste, que foram maceradas com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para um microtubo Eppendorf de 2 mL, adicionou-se 300 µL do Kit e colocou-se no Vortex por 1 minuto e a mistura foi incubada a 100°C por 14 minutos. A mistura foi centrifugada a 13,02 G por sete minutos e o sedimento resultante foi lavado duas vezes com etanol 70%. O sedimento foi seco, ressuspensão em 200 µL de água MilliQ e analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE (40 mM de base Tris, 20 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA) a 100 V durante aproximadamente 30 minutos e utilizou-se o corante Sybr Safe.

Foi realizada também a extração segundo Jacobs Jr e Hatfull (2000) com algumas modificações. Aproximadamente 0,5 g de massa fúngica, retirada das lamelas e haste, foi macerada com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para um microtubo Eppendorf de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL de PBS, 100 µL de SDS 10%, 200 µL 5M NaCl e 160 µL de CTAB e a mistura foi incubada durante 15 minutos a 65°C (invertendo o microtubo cada 5 minutos) antes da centrifugação por 10 minutos a 9,3 G. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo microtubo. Um volume igual de Clorofórmio Isoamílico (24:1) foi adicionado, e após a homogeneização do conteúdo do tubo foi centrifugado a 9,3 G durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o procedimento foi repetido, adicionando um volume igual de Clorofórmio Isoamílico (24:1) e após a homogeneização do conteúdo do tubo foi centrifugado a 9,3 G durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol (100%), a amostra descansou por 5 minutos e foi levada a centrifugação a 9,3 G por 10 minutos. Observou-se, então, a formação de um sedimento; caso não fosse possível a sua visualização, seria necessária a centrifugação por mais cinco minutos. O mesmo foi lavado duas vezes com álcool etílico 70%, centrifugando após as lavagens. O sedimento foi seco, ressuspensão em 200 µL de água MilliQ e analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE (40 mM de

base Tris, 20 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA) a 100 V durante aproximadamente 30 minutos e utilizou-se o corante Sybr Safe.

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou identificar os basidiomicetos em nível genérico e específico e formular protocolo de extração de DNA a partir de metodologias já utilizadas.

Em relação à identificação, pode-se perceber que há poucos materiais de consulta na literatura em português. Mesmo nos existentes em nossa língua, as principais dificuldades referem-se a não existirem chaves ou guias de identificação, somente encontram-se materiais com auxílios visuais, o que pode gerar obstáculos nas identificações devido à existência de espécies muito semelhantes morfológicamente, como aquelas ocorrentes no gênero *Mycena*, por exemplo.

Devido a essa problemática, foi necessário recorrer a chaves de identificação, em sua maioria, on-line (como MYCOKEY) e impressas de origem estrangeira (PETERSEN, 2012; LAESSOE, 2013).

Com essas chaves, foi possível identificar 25 gêneros e 34 espécies (Quadro 1). Além das identificadas há também 27 espécies não determinadas. Não é possível inferir, neste momento, se esse número é pequeno ou grande, ou até mesmo sua representatividade em termos de riqueza, uma vez que não há registros de levantamentos da biota fúngica na área de estudo e na região. Desta maneira, este trabalho caracteriza-se como pioneiro na Mata da Câmara.

Do total de espécies coletadas, foram selecionadas para a extração de DNA quatorze, em função da quantidade de massa fúngica e estado de conservação das amostras.

Em relação à formulação de banco de DNA e adaptação de protocolo, pudemos perceber que este objetivo foi parcialmente contemplado, uma vez que ainda não foi possível criar o banco de DNA conforme estipulado.

Segundo Chiari, Valle e Resende (2009) o problema mais frequente ligado à extração de DNA de qualidade é a contaminação do DNA isolado por fenóis e polissacarídeos. Em nosso trabalho, pudemos detectar esses mesmos problemas no momento em que fizemos a extração e realizamos a eletroforese em gel de agarose.

O trabalho iniciou-se com a busca pelo melhor método de conservação dos basidiomicetos que foram utilizados.

**Quadro 1.** Relação de basidiomicetos circunscritos em famílias, gêneros e, quando possível, espécies.

<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>
Agaricaceae	<i>Bovista</i>	sp
	<i>Coprinus</i>	sp1, sp2
	<i>Cyathus</i>	<i>C. striatus</i>
	<i>Agaricus</i>	sp
	<i>Lycoperdon</i>	sp
Auriculariaceae	<i>Auricularia</i>	<i>A. auricula-judae</i>
Cortinariaceae	<i>Cortinarius</i>	sp1, sp2, sp3
Gomphaceae	<i>Ramaria</i>	sp
Helotiaceae	<i>Chlorociboria</i>	<i>C. aeruginascens</i>
Hydnangiaceae	<i>Laccaria</i>	sp1, sp2
Inocybaceae	<i>Inocybe</i>	sp
Lycoperdaceae	<i>Vascellum</i>	sp
<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>
Marasmiaceae	<i>Marasmius</i>	sp1, sp2
	<i>Gymnopus</i>	sp
	<i>Hymenopellis</i>	sp
Mycenaceae	<i>Mycena</i>	sp1, sp2
Polyporaceae	<i>Trametes</i>	sp
	<i>Favolus</i>	<i>F. tessellatulus, sp</i>
	<i>indet.</i>	<i>Indet.</i>
Psathyrellaceae	<i>Coprinellus</i>	sp
	<i>Coprinopsis</i>	sp
Pyronemataceae	<i>Scutellinia</i>	sp
Russulaceae	<i>Lactarius</i>	sp1, sp2, sp3
Sarcoscyphaceae	<i>Cookeina</i>	sp
Strophariaceae	<i>Phoilota</i>	sp
	<i>Agrocybe</i>	<i>A. perfecta</i>

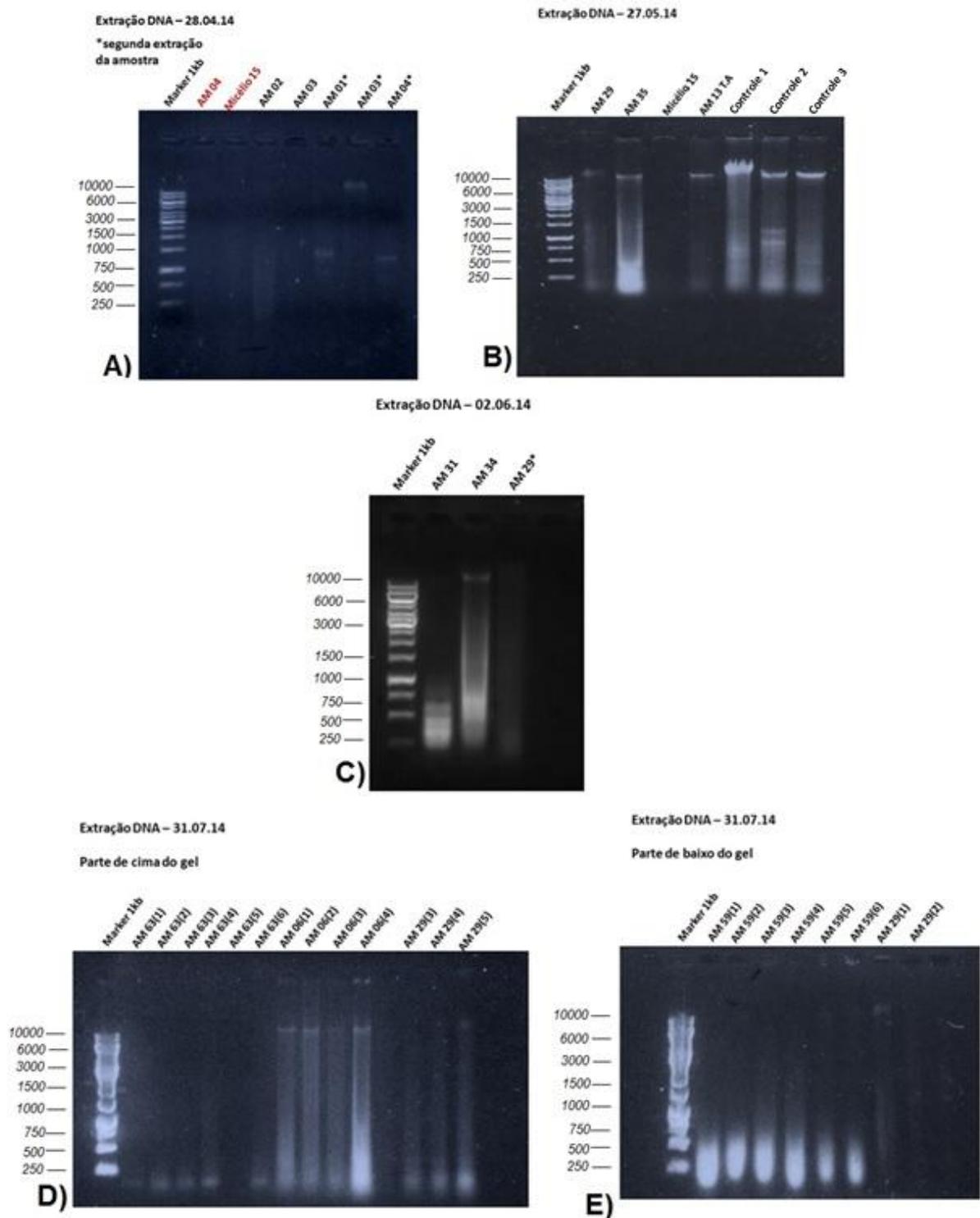
As amostras conservadas em álcool gel 70° GL desidrataram o que dificultou o manuseamento no momento da extração. No armazenamento com glicerina P.A., a amostra ficou com uma camada desse material aderida em sua estrutura, evento que trouxe obstáculos para a extração, acontecendo o mesmo com o óleo mineral, que além desse problema, também acarretou em contaminação por outros fungos oportunistas em algumas amostras. O método que melhor conservou as amostras e suas propriedades foi o de congelamento.

Primeiramente, foi utilizado o protocolo de Dias *et al.* (2012) para a extração de DNA de basidiomicetos, porém ao realizar a eletroforese em gel de agarose 1%, não houve a presença de bandas (Fig. 4) nas amostras 02, 03, 01\*, 03\* e 04\*, o que nos indica que esse protocolo foi parcialmente deficiente para extração de DNA de basidiomicetos (os números com \* indicam a segunda extração dessa amostra).

Na sequência, realizou-se a extração de basidiomicetos utilizando o kit PrepMan Ultra do fabricante Life, mas ao realizar a eletroforese com gel de agarose a 1% também não houve a presença de bandas nas amostras 04 e micélio-15 (Fig.4); essas observações indicam que esse kit parece não ser funcional para o tipo de fungo trabalhado, além de ser um método de alto custo financeiro.

Realizou-se, então, a extração utilizando o protocolo segundo Jacobs Jr e Hatfull (2000), porém com adaptações. Ao realizar a eletroforese em gel de agarose 1% foi possível perceber a formação de bandas (Fig. 4), mas pode-se notar a presença de muitas impurezas, o que mostra que esse protocolo necessita de adaptações. Em um dos géis de agarose (Fig.4) foi realizada também a eletroforese de três amostras controle cujo o DNA fúngico já era conhecido. Essas amostras foram consideradas como controle positivo na comparação com as amostras de fungos usando esse protocolo.

Após realizamos novamente o método de extração e a eletroforese em gel de agarose (Fig. 4), observamos que o *pellet* ficou com um aspecto gelatinoso em algumas amostras, como é descrito por Romano e Brasileiro (1999), quando há a presença de polissacarídeos na amostra de DNA. Algumas bandas do gel tiveram também um grande arraste, indicando que o DNA foi degradado no momento da extração; isso pode demonstrar que esse método pode ter sido agressivo para aquele basidiomiceto.



**Figura 4** – Eletroforese realizada nas espécies de basidiomicetos selecionados. A) Gel de agarose 1% realizado com amostras de DNA extraído segundo o protocolo de Dias *et al.* (2012) e o kit PrepMan Ultra do fabricante Life (amostras em vermelho). B) Gel de agarose 1% realizado com amostras de DNA extraído segundo o protocolo Jacobs Jr e Hatfull (2000). C) Gel de agarose 1% realizado com amostras de DNA extraído segundo o protocolo Jacobs Jr e Hatfull (2000). D) Gel de agarose 1% realizado com amostras de DNA extraído segundo o protocolo Jacobs Jr e Hatfull (2000).

Nucleases fúngicas e altos teores de polissacarídeos aumentaram as dificuldades no isolamento de DNA a partir de fungos filamentosos (Zhang *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1998 *apud* MELO, 2006). Todos os métodos têm em comum a utilização de detergentes tais como SDS para a lise da parede celular, e isso muitas vezes inibe manipulações adicionais de purificação. Como uma alternativa à lise por SDS, produtos químicos tóxicos, por exemplo, fenol, têm sido utilizados (Cheng e Jiang, 2006 *apud* MELO, 2006).

## CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse projeto possui etapas bem distintas: a coleta das espécies fúngicas, conservação das amostras, a identificação de cada espécie fúngica, extração do DNA e a confirmação da extração com o método da eletroforese em gel de agarose. A etapa laboratorial só foi possível graças à credibilidade e confiança do Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, que coordena o Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, uma vez que no IFSP-São Roque não havia na época do desenvolvimento do trabalho, os equipamentos e os reagentes necessários para o projeto.

Nas saídas de campo, foi possível coletar 25 gêneros e 34 espécies diferentes de basidiomicetos, além das espécies ainda não identificadas. O registro fotográfico e as anotações de suas características morfológicas são imprescindíveis para a identificação de cada espécie, pois os basidiomicetos são muito sensíveis degradando minutos após sua retirada do habitat natural, sendo assim perdem as suas características peculiares. Sem essas características, uma falsa identificação pode ocorrer.

A identificação foi realizada com o uso de chaves de identificação on-line e livros. Há, porém carência de chaves de identificação na literatura brasileira, fato que dificultou a identificação uma vez que há espécies endêmicas brasileiras.

A proximidade morfológica das espécies fúngicas pode ser um obstáculo para uma identificação completa, uma vez que pode causar confusão em detalhes importantes para seguir com alguns passos das chaves de identificação.

Inicialmente, a proposta era criar um banco de DNA para as espécies de basidiomicetos coletados na Mata da Câmara. Quando iniciada a etapa da extração de DNA, percebemos que seria necessário adaptar um protocolo para que as extrações fossem realizadas. Foram testados, portanto, três métodos e percebemos que não seria possível padronizar um único protocolo para a divisão Basidiomycota inteira, pois cada espécie apresenta uma estrutura morfológica e composição bioquímica diferentes. Desta maneira, concluímos que talvez não exista um protocolo específico para todos os Basidiomycota e, sim, a necessidade de adaptar o protocolo de acordo com a espécie.

Nas etapas de lavagem com Clorofórmio Isoamílico (24:1), o tempo de centrifugação e a limpeza com o detergente são de extrema importância para o resultado final, já que, dependendo da espécie, o número de lavagens com Clorofórmio Isoamílico (24:1) pode degradar o DNA; em relação ao tipo e a quantidade de detergente, isso depende da quantidade de lipídeos que a espécie apresenta. Dos três protocolos testados, um mostrou-se viável (congelamento). Sendo proposto para futuros trabalhos a conservação em nitrogênio líquido após a coleta a fim de conservar melhor a qualidade das amostras para a extração de DNA.

Vale ressaltar que a etapa final do acetato de amônio é importante para a purificação das amostras, pois faz a limpeza de polissacarídeos uma vez que a membrana celular fúngica é rica em polissacarídeos. Essa etapa demonstra um DNA de qualidade – desta forma, quando se realizar a eletroforese em gel de agarose serão obtidas bandas de DNA íntegras.

No mundo científico não há muitos trabalhos realizados nessa área; não existem muitos protocolos para a extração de DNA fúngico da divisão Basidiomycota. Este fato dificulta o trabalho, pois é necessário fazer uma seleção dos protocolos que sejam mais viáveis e realizar as adaptações de acordo com os resultados da eletroforese em gel de agarose.

Com um DNA de qualidade extraído, é possível realizar um banco de DNA das espécies fúngicas presentes na Mata da Câmara para que, futuramente, possa ser realizada uma análise filogenética dessas espécies com base em caracteres moleculares.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al. Fundamentos da Biologia Celular*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 864 p.

BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1999.

BUSO, G. S. C.. Marcadores Moleculares e Análise Filogenética. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, v. 1, n. 1, p.7, 2005.

CALVANESE, V. de C.; PEREIRA, M. Levantamento preliminar dos miriápodes ocorrentes na serrapilheira de um fragmento de floresta estacional semidecidual em São Roque, SP. *Scientia Vitae*, vol. 1, n. 2, ano 1, out-dez. 2013, p. 12-19. Disponível em: <[www.revistafpsr.com/](http://www.revistafpsr.com/)>; acesso em: 25/04/2013.

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R. do; RESENDE, R. M. S.. *Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em Stylosanthes guianensis*. 2009. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/ct/ct36/CT36.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2014.

DIAS, L.; CARVALHO, L. F. de; ROMANO, C. C. Application of PCR in Serum Samples for Diagnosis of *Paracoccidioidomycosis* in the Southern Bahia-Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 6, n. 11, nov. 2012: e1909. doi:10.1371/journal.pntd.0001909.

FREDRICKS, D. N.; SMITH, C.; MEIER, A. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 10, p.5122-5128, out. 2005.

GUERRA, R. A. T. *et al. Cadernos Cb Virtual 2*. João Pessoa: Universitária, 2011. Disponível em: <[http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo\\_site/Biblioteca/Livro\\_2/5-fungos\\_briofitas.pdf](http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo_site/Biblioteca/Livro_2/5-fungos_briofitas.pdf)>. Acesso em: 26 abr. 2014.

JACOBS JUNIOR, W. R.; HATFULL, G. F.. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Washington: Asm Press, 2000.

KENNEDY, J. *et al.* Diversity of microbes associated with the marine sponge, *Haliclona simulans*, isolated from Irish waters and identification of polyketide synthase genes from the sponge metagenome. *Environ Microbiol.*, v. 7, n. 10, p.1888-1902, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430018>>. Acesso em: 10 maio 2014.

KIIHL, S. F. *Análise Estatística de Polimorfismo Molecular em Sequências de DNA Utilizando Informações Filogenéticas*. 2005. 155 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de

Estatística, Departamento de Departamento de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000349538>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

LAESSOE, T. *Mushrooms: How to identify and gather wild mushrooms and other fungi*. Londres: Dorling Kindersley, 2013.

LUIZ, F. C. J. P. F.. *Identificação fenotípica e genotípica de fungos filamentosos isolados de talcos comerciais cosméticos*. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/24080/DISSERTACAOFlaviaLuiz.pdf;jsessionid=1CA3E6BD0F50BFB46C3E92B8B2EBF61D?sequence=1>>. Acesso em: 01 nov. 2014.

MAIA, LC., and CARVALHO JUNIOR, AA. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, RC., org., *et al.* INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Catálogo de plantas e fungos do Brasil* [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 43-48. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

MANJUNATHAN, J.; KUMAR, M.; KAVIYARASAN, V.. Taxonomic studies, rapid and efficient protocol for DNA extraction, purification, molecular characteristics of the basidiomycete *Lentinus tuberregium* (FR) GQ292711. *Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research*, Índia, v. 4, p.54-58, 2011. Disponível em: <[www.ajpcr.com/Vol4Issue2/255.pdf](http://www.ajpcr.com/Vol4Issue2/255.pdf)>. Acesso em: 11 ago. 2014.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M.. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 41, p.12-17, dez. 2000. Disponível em: <[www.cnpf.embrapa.br/publica/boletim/boletarqv/boletim41/mazza.pdf](http://www.cnpf.embrapa.br/publica/boletim/boletarqv/boletim41/mazza.pdf)>. Acesso em: 17 ago. 2014.

MELO, S.C.O *et al.* Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete *Crinipellis pernicios*a. **Genetics And Molecular Research**, Ilhéus, v. 4, n. 5, p.851-855, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183493>>. Acesso em: 11 out. 2014.

MUZZI, M. R. S. *et al.* *Taxonomia de criptógmas Fungos: Filo Basidiomycota*, Belo Horizonte, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.terrabrasil.org.br/ecotecadigital/pdf/taxonomia-de-criptogmas-fungos-filo-basidiomycota.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2014.

PAULA, C. R.. *Fungos*. Disponível em: <[http://www.icb.usp.br/~crpmicol/materiais/apostila\\_fungos.pdf](http://www.icb.usp.br/~crpmicol/materiais/apostila_fungos.pdf)>. Acesso em: 01 nov. 2014.

PETERSEN, J.H. *The Kingdom of Fungi*. Dinamarca: Gyldendal, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M.. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, [s.l.], v. 2, n. 9, p.40-43, ago. 1999. Disponível em: <[http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/bio\\_9.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/bio_9.pdf)>. Acesso em: 17 ago. 2014.

SILVA, R. R. da; COELHO, G. D. *Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas*. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. Disponível em: <[http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos\\_Ricardo\\_Silva\\_e\\_Glauceane\\_Coelho.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauceane_Coelho.pdf)>. Acesso em: 26 abr. 2014.

SIMPSON, M.G. *Plant Systematics*. 2.ed. Nova Iorque: Elsevier, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

#### **Referências de sítios eletrônicos da Internet:**

<http://www.indexfungorum.org>; acesso em: 11 out. 2014.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; acesso em: 11 out. 2014.

<http://www.mycobank.org>; acesso em: 26 abr. 2014.

<http://www.mushroomexpert.com/index.html>; acesso em: 23 abr. 2014.

<http://www.mycology.com/newMycoKeySite/MycoKeyIdentQuick.html>; acesso em: 23 abr. 2014.

## ANEXOS – Registro fotográfico

Neste anexo estão contempladas as espécies (determinadas e indeterminadas) de fungos basidiomicetos encontrados na área de estudo, agrupados por famílias.

### A) Agaricaceae

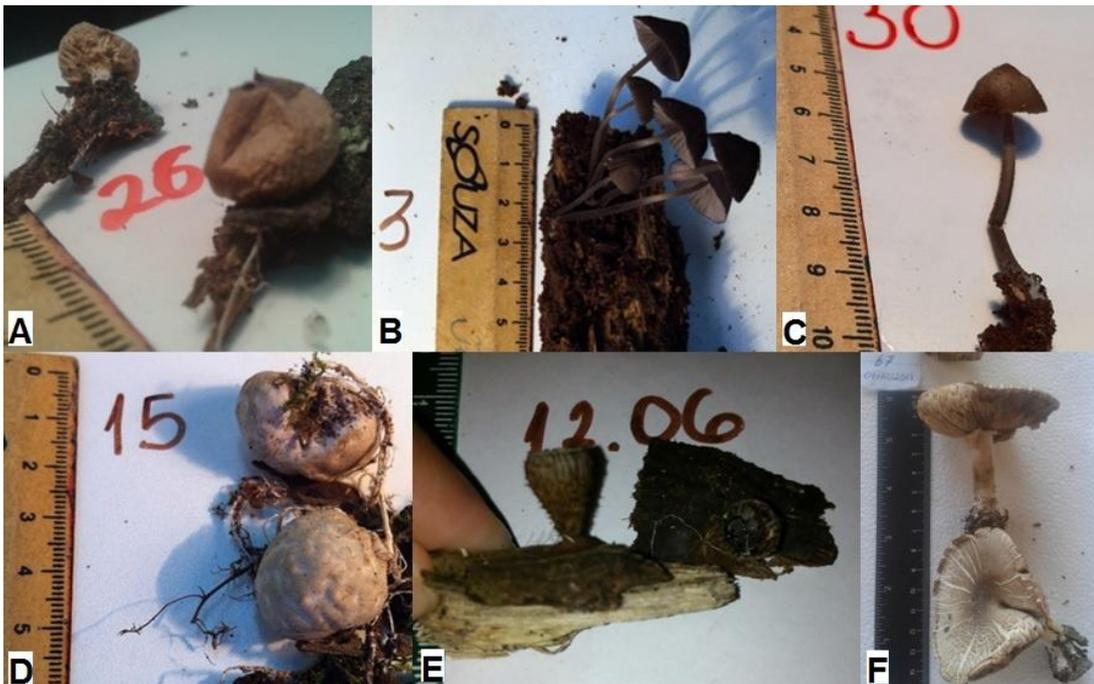


Figura 5 – A) *Lycoperdon* sp; B) *Coprinus* sp1; C) *Coprinus* sp2; D) *Bovista* sp; E) *Cyathus striatus*; F) *Agaricus* sp.

### B) Auriculariaceae



Figura 6 - *Auricularia auricula-judae*.

## C) Cortinariaceae



Figura 7 – A) *Cortinarius* sp1; B) *Cortinarius* sp2; C) *Cortinarius* sp3.

## D) Gomphaceae



Figura 8 - *Ramaria* sp.

## E) Helotiaceae



Figura 9 - *Chlorociboria aeruginascens*.

## F) Hydnangiaceae



Figura 10 – A) *Laccaria* sp1; B) *Laccaria* sp2.

## G) Inocybaceae

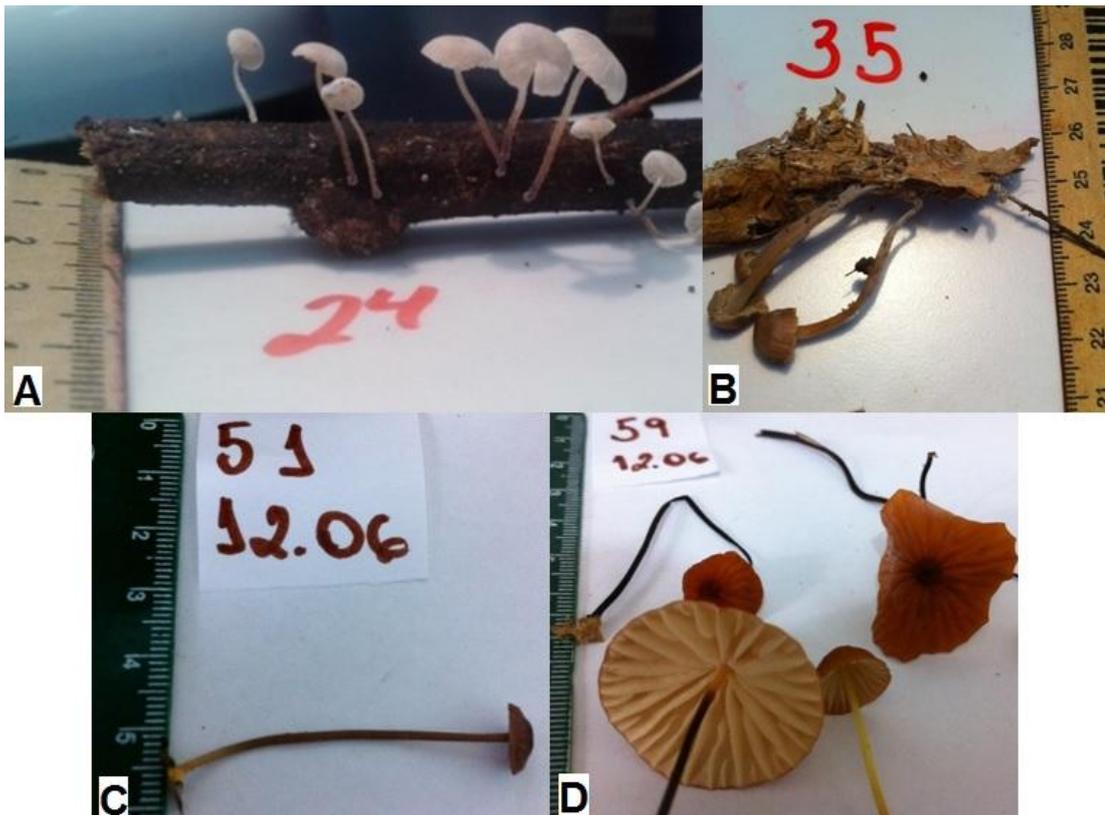


Figura 11 - *Inocybe* sp.

## H) Lycoperdaceae

Figura 12 - *Vascellum* sp.

## I) Marasmiaceae

Figura 13 – A) *Marasmius* sp1; B) *Gymnopus* sp; C) *Hymenopellis* sp; D) *Marasmius* sp2.

## J) Mycenaceae



Figura14 – A) *Mycena* sp1; B) *Mycena* sp2.

## K) Polyporaceae

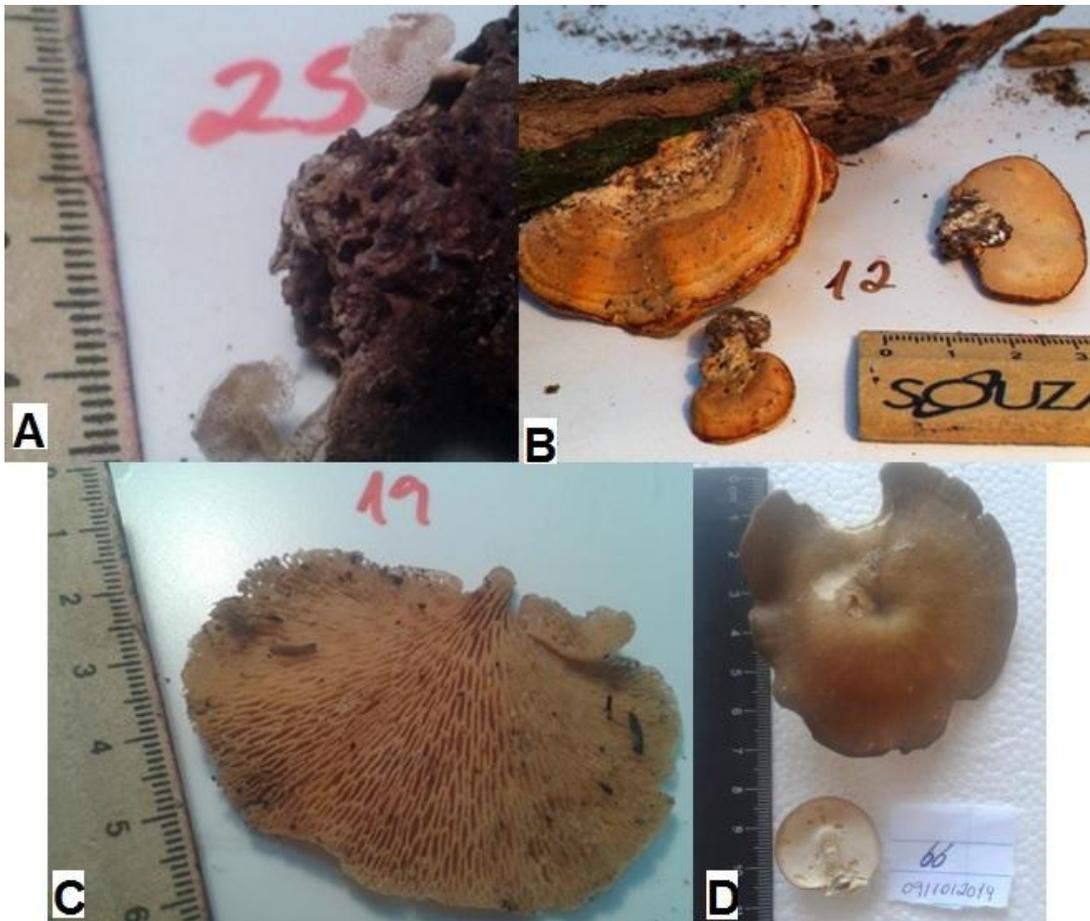


Figura 15 – A) *Favolus* sp; B) *Trametes* sp; C) *Favolus tessellatus*; D) indeterminado.

## L) Psathyrellaceae

Figura 16 – A) *Coprinopsis* sp; B) *Coprinellus* sp.

## M) Pyronemataceae

Figura 17 - *Scutellinia* sp.

## N) Russulaceae



Figura 18 – A) *Lactarius* sp1; B) *Lactarius* sp2; C) *Lactarius* sp3.

## O) Sarcoscyphaceae



Figura 19 - *Cookeina* sp.

## P) Strophariaceae



Figura 20 – A) *Phoilota* sp; B) *Agrocybe perfecta*.

## Q) Indeterminados



Figura 21 – Gêneros e espécies não determinados.



Figura 22 – Gêneros e espécies não determinados.

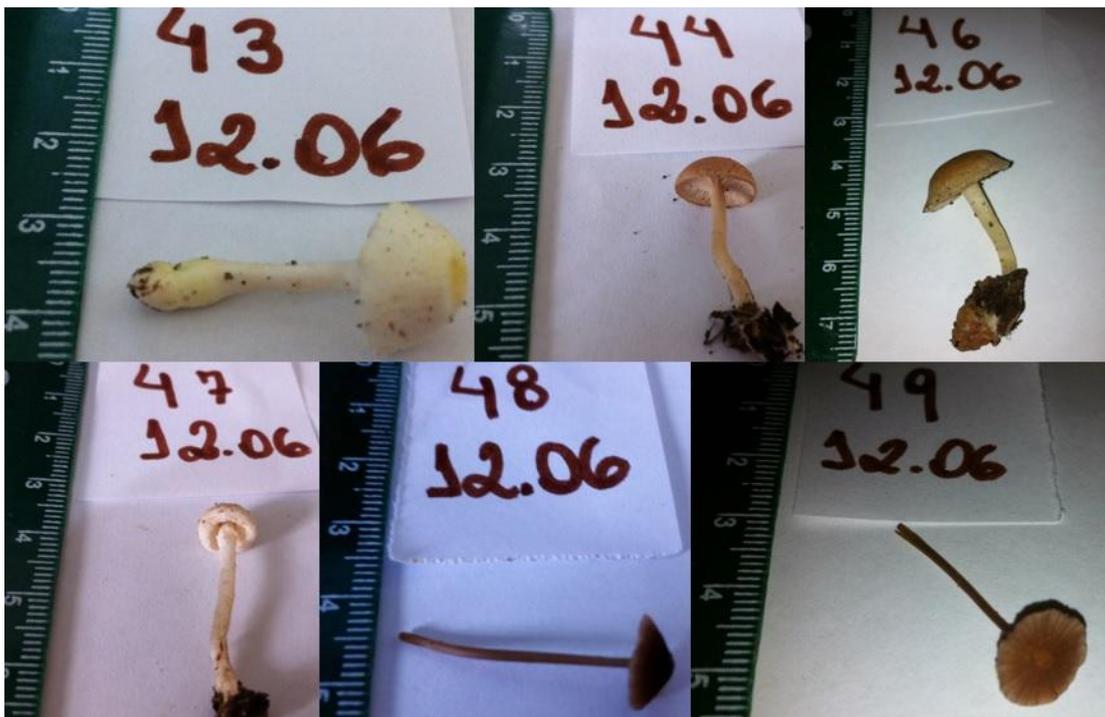


Figura 23 – Gêneros e espécies não determinados.



Figura 24 – Gêneros e espécies não determinados.



Figura 25 – Gêneros e espécies não determinados.