



Sarah Samuel Schneider

***Agaricus dulcidulus* S. Schulzer (AGARICALES,  
BASIDIOMYCOTA): um estudo de caso sobre a  
ocorrência de nomes de cogumelos europeus no Brasil**

Trabalho de Conclusão  
de Curso submetido ao  
Curso de Ciências  
Biológicas da  
Universidade Federal de  
Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de  
bacharel em Ciências  
Biológicas  
Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>  
Maria Alice Neves

Florianópolis  
2016



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor.  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca  
Universitária da UFSC.

Schneider, Sarah Samuel

*Agaricus dulcidulus* (AGARICALES, BASIDIOMYCOTA): um  
estudo de caso sobre a ocorrência de nomes de cogumelos europeus no Brasil /  
Sarah Samuel Schneider; orientadora , Maria Alice Neves – Florianopolis , SC,  
2016.

63 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.  
Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Fungos. 3. Agaricus. 4. Banco de dados. I. Neves, Maria  
Alice. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências  
Biológicas. III. Título.



Sarah Samuel Schneider

***Agaricus dulcidulus* S. Schulzer (AGARICALES,  
BASIDIOMYCOTA): um estudo de caso sobre a  
ocorrência de nomes de cogumelos europeus no Brasil**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de bacharel em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências de Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 02 de Dezembro de 2016

---

Prof. Dr. Maria Risoleta Freire Marques  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Maria Alice Neves  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Presidente

---

Prof. Dr. Mayara Caddah  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Elisandro Ricardo Dreschler dos Santos  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

Muito se tem pra agradecer nesses anos de Biologia, a realização desse trabalho só foi possível com a ajuda de muitas pessoas essenciais que me promoveram um amadurecimento tanto pessoal quanto acadêmico.

Agradeço primeiramente meus pais, pois sem o apoio e confiança deles, eu não teria conseguido ter aproveitado de uma maneira plena todos esses anos de Biologia.

Eu costumo dizer que a Biologia é um mundo paralelo de pessoas incríveis, e muitas dessas, são os professores que instigam e mostram o mundo maravilhoso da bio. e nos ensinam a sermos pessoas melhores. Zanetti, Paulinho, Marguerita, Paulo Hoffmann, Patrícia, André Ramos, Geison, obrigada por todo o conhecimento e dedicação.

Um obrigada mais que especial para minhas flores, que fizeram a minha Biologia ser um mundo de cor, onde eu pude amadurecer e conhecer pessoas iguais a mim, minhas irmãs de alma. Malu, Júlia, Aninha, Fe, Ari, Camilinha, Drica, Mary. Sem vocês nada faria sentido.

Agradeço a um dos maiores amores da minha vida, Mael, sem você eu não teria tido tanta coragem. Você sempre ocupará um grande espaço no meu coração.

Dentre tantos presentes que a Biologia me proporcionou, poder ter conhecido o pessoal do Micolab com toda certeza foi um dos melhores. Considero vocês uma família, um lugar não só de aprendizado acadêmico mas de vida, cada pessoinha somou muito nesses últimos anos de curso, sem vocês eu não teria finalizado tão lindamente. Um beijo mais que especial pra Mari D., Marizinha Maruca, Duda, Meli, Pam, Denyse, Fe, vocês tornaram os dias no lab. mais alegres, obrigada por cada ensinamento, abraço, café e sorrisos trocados. Cauê por ter sido o primeiro a me ensinar sobre cultivo de cogumelos, e sua paixão por eles ser inspiradora. Samuquinha, por todos os ensinamentos, preocupação e abraços sinceros.



E um agradecimento muito especial pra minha orientadora, que me acolheu e confiou em mim nessa jornada final. Maria, você é um exemplo de força e determinação, uma excelente educadora e pesquisadora, e a dona da gargalhada mais contagiosa. Obrigada pelos conselhos sinceros, e por mostrar que a vida só importa quando fazemos aquilo que realmente gostamos.

“A Biologia ensinou-me coisas fundamentais. Uma delas foi a humildade. Esta nossa ciência me ajudou a entender outras linguagens, a fala das árvores, a fala dos que não falam. A Biologia me serviu de ponte para outros saberes. Com ela entendi a Vida como uma história, uma narrativa perpétua que se escreve não em letras mas em vida.” ( Mia Couto)

## RESUMO

*Agaricus* L. (Agaricaceae, Agaricales) é um gênero de Basidiomycota, de distribuição mundial. Possui muitas espécies conhecidas por seu alto valor nutricional e medicinal. A diversidade do gênero é pouco conhecida nas áreas tropicais e subtropicais. Métodos moleculares como o sequenciamento de regiões do DNA e o uso da região ITS como código de barras para fungos ajudaram a aumentar o conhecimento sobre a diversidade. Porém, há alguns fatores limitantes como espécimes identificados erroneamente nos bancos de dados. Assim, revisões de herbários são importantes, principalmente no reino Fungi, pois existe uma grande diversidade de macrofungos que ainda é pouco conhecida no País, e muitos espécimes receberam, ao longo dos anos, nomes de espécies Europeias ou Norte Americanas pela falta de estudos e de chaves de identificação que incluam táxons brasileiros ou mesmo neotropicais. *Agaricus* possui ampla distribuição mundial e tem cerca de 100.000 espécies descritas. *Agaricus dulcidulus* S. Schulzer (1874) é um cogumelo (Agaricaceae) europeu que foi escolhido como estudo de caso para este trabalho. Existem treze registros de *A. dulcidulus* no Brasil de acordo com dados dos herbários que possuem coleções online (SpLink). Para confirmar a ocorrência do táxon no Brasil foi utilizada a caracterização molecular de espécimes brasileiros morfológicamente similares a *A. dulcidulus*. Para comparação um espécime de *A. dulcidulus* proveniente da República Tcheca foi usado como parâmetro. As sequências geradas foram utilizadas para gerar uma hipótese de proximidade utilizando o marcador ITS como código de barras incluindo ainda sequências ITS de *Agaricus dulcidulus* obtidas do GenBank e do Plutof. Os resultados indicam que *A. dulcidulus* possivelmente não ocorre no Brasil. A temática abordada nesse projeto visa trazer a problemática do uso de nomes errados de espécie, da falta de especialistas em *Agaricus* no País e da necessidade de uma melhor curadoria dos dados

incluídos nos repositórios online, seja de herbários ou bibliotecas de sequências moleculares.

**Palavras-chave:** *Agaricus*. Banco de dados online. Curadoria

## ABSTRACT

*Agaricus* L. (Agaricaceae, Agaricales) is a genus of Basidiomycota, worldwide distributed. It has many species known for its high nutritional and medicinal value. The diversity of the genus is little known in tropical and subtropical areas. Molecular methods with sequencing of DNA regions and the use of the ITS region as barcode for fungi helped to increase knowledge about the diversity. However, there are some limiting factors as specimens mistakenly identified in the databases. Thus, herbarium revisions are important, especially in the Fungi kingdom, because there is a great diversity of macrofungos that is still little known in the country, and many specimens have received, over the years, European or North American species names due to lack of studies and Identification keys that include Brazilian or even Neotropical taxa. *Agaricus* has a wide distribution worldwide and has about 100,000 species described. *Agaricus dulcidulus* S. Schulzer (1874) is a European mushroom (Agaricaceae) that was chosen as a case study for this work. There are thirteen records of *A. dulcidulus* in Brazil according to herbarium data that have online collections (SpLink). To confirm the occurrence of the taxon in Brazil, the molecular characterization of Brazilian specimens morphologically similar to *A. dulcidulus* was used. For comparison, a specimen of *A. dulcidulus* from the Czech Republic was used as a parameter. The generated sequences were used to generate a proximity hypothesis using the ITS marker as a barcode further comprising ITS sequences of *Agaricus dulcidulus* obtained from GenBank and Plutof. The results indicate that *A. dulcidulus* probably does not occur in Brazil. The theme addressed in this project aims to bring up the problem of the use of wrong names of species, the lack of specialists in *Agaricus* in the country and the need for better curation of data included in online repositories, be it herbariums or libraries of molecular sequences.

**Keywords:** Agaricus. Database. Curatorship

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Basidiomas de *Agaricus* sp. em campo, Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Caraguatatuba, SP.

Figura 2. Árvore filogenética representada por 3 seções em *Agaricus*, gerada a partir do marcador ITS, com a topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS/ valores de PP. Os espécimes destacados em negrito representam as sequências geradas durante este trabalho a partir de espécimes coletadas em São Paulo.





## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Protocolo do termociclo utilizado na reação de PCR para a região do DNA



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
MICOLAB – Laboratório de Micologia

cm – centímetro

comp. – comprimento

diam. – diâmetro



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1 OS FUNGOS, DIVERSIDADE E COLEÇÕES BIOLÓGICAS .....	25
1.2 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DE <i>AGARICUS</i> ..	29
1.3 MORFOLOGIA <i>AGARICUS DULCIDULUS</i> .....	31
1.4 DISTRIBUIÇÃO NO MUNDO E NO BRASIL.....	32
1.5 JUSTIFICATIVA .....	33
<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>34</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 COLETAS E PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO .....	35
3.2 COLEÇÕES EXAMINADAS .....	35
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
4.1 ESTUDO TAXONÔMICO DE <i>AGARICUS</i> <i>DULCIDULUS</i> .....	41
4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS MOLECULARES....	44
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>58</b>



## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 OS FUNGOS, DIVERSIDADE E COLEÇÕES BIOLÓGICAS**

Os fungos são organismos extremamente importantes na natureza, atuando como decompositores e interagindo com uma grande variedade de organismos de diversos grupos. Estas interações foram possíveis, devido a sua evolução, em que se adaptaram a diferentes nichos, com diversas funções ecológicas. Além do papel ecológico, os fungos também têm grande importância em vários setores econômicos, como o agrícola, medicinal, biotecnológico e alimentício (Blackwell 2011).

Apesar do reconhecimento da importância dos fungos, pouco se conhece acerca da diversidade destes. As estimativas do número de espécies no reino são variáveis. Cálculos recentes baseado em métodos moleculares sugerem a existência de 1,5 (Hawksworth 2001) a 5,1 milhões de espécies (O'Brien et al. 2005). No entanto, atualmente só foram descritas aproximadamente 100.000 espécies (Kirk et al. 2008), menos de 10% da diversidade estimada de 1,5 milhões. Esta lacuna entre a diversidade conhecida e estimada, fez com que diversos micólogos sugerissem a possibilidade de ocorrência de fungos ainda desconhecidos em florestas tropicais. Há também a ocorrência de fungos formando

associações pouco conhecidas com musgos, plantas marinhas, algas, rochas, solo, resíduos vegetais e no rúmen de mamíferos herbívoros (Hawksworth 2001).

Os métodos moleculares, como o sequenciamento de DNA e o uso da região ITS como código de barras para fungos, ajudaram a aumentar o conhecimento sobre a diversidade desses organismos. Estas técnicas auxiliaram a solucionar problemas advindos de hipóteses baseadas apenas em características morfológicas. Assim, permitiu um conhecimento aprimorado da diversidade de espécies e das relações filogenéticas dentro do reino (Blackwell 2011).

Os bancos de dados virtuais, disponibilizam informações sobre os táxons, facilitam o conhecimento sobre a diversidade e permitem um amplo acesso dos registros de ocorrência de espécimes. A correta identificação taxonômica dos materiais é crucial para a qualidade dos dados disponibilizados nestas ferramentas.

Taxonomistas estão conscientes da uma grande quantidade de exemplares identificados erroneamente nos bancos de dados, devido à falta de especialistas ou uso do conceito inapropriado de espécie (Smith et al. 2016). O problema se torna óbvio ao se analisarem os mais importantes bancos públicos de sequências de DNA como o GenBank, o qual possui suas sequências diretamente ligadas com a



identificação taxonômica, e o Projeto *Barcoding*, que serve como referência para fins de identificação. A precisão das identificações taxonômicas desses bancos tem sido questionada especialmente para fungos, para os quais se estima que aproximadamente 20% das sequências depositadas foram nomeadas erroneamente (Smith et al. 2016).

Brock et al. (2008) sugerem que 70% da diversidade taxonômica dos materiais nos herbários não está representado em banco de dados públicos. Isso dificulta a resolução de problemas taxonômicos, pois os espécimes armazenados em herbário podem oferecer material genético, passível de comparação com outras sequências, incluindo de espécies tipo, o que permite um link direto entre o nome das espécies e as sequências (Hosaka 2013). No entanto, a qualidade do DNA destes materiais depende de como os espécimes foram coletados (Bruns et al. 1990, Drabkova 2002) preparados e mantidos (Hosaka 2013).

Para que os bancos de dados virtuais e herbários sejam mais facilmente curados, é importante acrescentar informações adicionais de coleta, os metadados, que fornecem mais clareza, por exemplo, sobre a distribuição geográfica e nicho ecológico das espécies. Porém, estas informações não são exigidas em bancos de dados, como o *GenBank*, que não possui um vocabulário próprio para especificar informações,

o que deixa os autores livres para decidir como e qual informação disponibilizar.

Isso faz com que haja divergências em nomes de espécies e linhagens taxonômicas elevadas, devido a diferentes opiniões na taxonomia, bem como na tradição de ecologistas e taxonomistas (Abarenkov 2010).

A problematização da importância da utilização do nome científico correto para os táxons se reflete não só em uma área remota da ciência, mas influencia também em outras áreas como a medicina, paleontologia e bioquímica, gerando um atraso nas pesquisas científicas, e até na perda de vidas humanas (Bortolus 2008).

Devido a isso, as revisões das coleções de fungos em herbários brasileiros são importantes, pois existe uma diversidade de espécies endêmicas pouco conhecidas que por vezes são confundida e mal identificadas como espécies de ocorrência Europeia ou Norte Americana.

## 1.2 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DE *AGARICUS*

*Agaricus* L. (Agaricaceae, Agaricales) é um gênero representado por cogumelos sapróbios, geralmente terrícolas e de distribuição mundial. Possui muitas espécies conhecidas por seu alto valor nutricional e medicinal, e por isso é um gênero bastante estudado. O gênero possui aproximadamente 250 espécies descritas com estimativa da existência de 400 espécies (Zhao et al. 2011).

Apesar da importância ecológica e do interesse econômico, a diversidade das espécies do gênero ainda é pouco conhecida, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, das quais muitas espécies têm sido descritas (Zhao et al. 2011).

Atualmente, grande parte da análise morfológica e sistemática de *Agaricus* foi feita por trabalhos micológicos na Europa, América do Norte, Ásia tropical e África. Por esse motivo, espécies tropicais são difíceis de identificar ou descrever, pois a descrição e classificação dessas tem tido como base o uso da sistemática tradicional de espécies de regiões temperadas (Zhao et al. 2011)

Apesar de ser um gênero diverso, as espécies possuem poucas características fenotípicas que as delimitam,

além da grande variabilidade intra-específica o que dificulta a identificação de espécies em campo (Zhao et al. 2011). Os cogumelos do gênero *Agaricus* possuem diferentes tamanhos de basidioma (pequeno a grande); píleo com coloração branca, amarela ou marrom; lamelas livres, com coloração clara ou rosada quando jovem, tornando-se marrom quando madura; basidiósporo liso, elipsóide e de cor marrom (Geml et al. 2004). A formação do anel no estipe é complexa nesse gênero e serve para caracterizar subgênero, seções e espécies (Zhao et al. 2016).

O gênero apresenta um grande histórico de proposições taxonômicas. O conceito de *Agaricus* segundo autores clássicos como Heinemann (1961, 1977) e Singer (1986) é dividido em seções relacionadas às características morfológicas e de habitat. Zhao et al. (2016) propuseram uma revisão do sistema taxonômico do gênero considerando o tempo de divergência das espécies para estabelecer os níveis hierárquicos e segregaram o gênero em cinco subgêneros (*Agaricus*, *Flavoagaricus*, *Minores*, *Pseudochitonis* e *Spissicaules*) e 20 seções.

### 1.3 MORFOLOGIA *AGARICUS DULCIDULUS*

*Agaricus dulcidulus* Schulzer, que tem como sinônimos *A. semotus* e *A. purpurellus*, pertence ao subgênero *Minores* dentro da seção *Minores*, que é caracterizada por possuir espécies com reação de Schäffer e de KOH positivas; forte cheiro de anis ou amêndoa; anel simples e membranoso não sendo flocoso; queilocistídio simples (Chen et al. 2012).

O nome *Minores* foi proposto pela primeira vez em 1874, por Fries pra nomear um grupo em *Agaricus*. Essa seção é bem suportada em todos os estudos (Nauta 2001; Zhao et al. 2011; He & Zhao 2015). É um grupo que possui muitas espécies com ocorrência na Europa (He & Zhao 2015). Isso reforça a importância de se conhecer mais dos táxons dentro dessa seção que estão sendo coletados aqui no Brasil.

Algumas das características morfológicas mais marcantes dessa espécie são descritas a seguir.

**Pêlo** de (20-)30 a 60(-70)mm de diâmetro, cônico-convexo ou cônico truncado nos basidiomas jovens, convexo e achatado no centro a plano-convexo nos basidiomas maduros, coloração vinácea ou rosa acizentada, desbotada na margem, centro densamente fibriloso a fibriloso-esquamuloso com

fibrilas castanho avermelhadas no centro (Nauta 2001). **Estipe** de (15-)20 a 45(-80) de comprimento, por (2-)4-7(-10) mm de diâmetro, cilíndrico com base bulbosa a clavada, de coloração branca. **Anel** estreito, fino (Nauta 2001) e súpero (Zhao et al. 2016). **Himenóforo** lamelar, lamelas próximas e livres, rosado nos basidiomas jovens tornando-se marrom escuro nos basidiomas maduros (Nauta 2001).

#### 1.4 DISTRIBUIÇÃO NO MUNDO E NO BRASIL

*Agaricus dulcidulus* caracteriza-se por ser uma espécie de ampla ocorrência, tendo registros de espécies para as Américas (Canadá, Estados Unidos, Argentina, Bolívia, Brasil, Venezuela, Terra do Fogo, Trindade e Tobago), Ásia (Rússia, Azerbaijão, Japão, Israel) e Europa (Reino Unido, Dinamarca, França, Itália, Alemanha, Rússia, Ucrânia, Polônia, República Tcheca, Hungria) (Warchow 2005, Albuquerque 2010). No Brasil há registro de treze ocorrências da espécie nos estados de São Paulo, Rondônia, Minas Gerais, Amazonas, Pernambuco (*Species Link*).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Devido principalmente à grande diversidade do gênero *Agaricus* no Brasil, é necessária a discussão sobre a falta de revisões taxonômicas de materiais depositados em herbários, ou bibliotecas de sequências moleculares, principalmente pelo uso de chaves de identificação Europeias e Norte Americanas para identificar materiais brasileiros. Isso faz com que muitas espécies sejam nomeadas erroneamente, o que dificulta a informação sobre a sua distribuição geográfica. E também, dar enfoque para a problemática de identificação de espécies de *Agaricus* no Brasil, devido a falta de especialista e a importância para o uso de dados filogenéticos moleculares como uma ferramenta adicional além da taxonomia clássica.

## 2 OBJETIVOS GERAL

- Estudar se existe a ocorrência da espécie *Agaricus dulcidulus* no Brasil com base em espécies filogenéticas, utilizando apenas dados moleculares.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair, amplificar, sequenciar região ITS de espécimes depositadas em herbário com o nome de *Agaricus dulcidulus* e de espécimes coletados para este trabalho, macromorfológicamente semelhantes a *Agaricus dulcidulus*.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETAS E PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO

Foi realizada saída de campo, no início de 2016, em área de Mata Atlântica, no Parque Estadual da Serra do Mar Núcleo Caraguatatuba, no Estado de São Paulo. A coleta foi realizada pela colega Mariana Drewinski.

Em campo, os basidiomas encontrados foram fotografados, coletados com auxílio de um canivete e armazenados temporariamente em uma caixa com divisórias. Os espécimes tiveram suas descrições macroscópicas feitas a partir de características do basidioma fresco utilizando-se métodos tradicionais de descrição de cogumelos (Largent 1986). As cores seguiram os códigos do guia de cores *Online Auction Color Chart* (Kramer 2004). As características observadas e descritas foram dimensões, formato, superfície, coloração do píleo e do estipe, hábito e habitat do basidioma. Os espécimes foram desidratados em uma desidratadora de frutas a 40°C por aproximadamente 24 horas ou até a completa desidratação do material para, então, serem armazenados em sacos plásticos hermeticamente fechados.

#### 3.2 COLEÇÕES EXAMINADAS

Foi realizado levantamento de espécimes identificados como *Agaricus dulcidulus* depositados em Herbários no Brasil. Para isso, repositórios online como o Reflora e o Species Link foram consultados. O banco de dados Species Link lista 13 espécimes identificados como *Agaricus dulcidulus*, os quais estão distribuídos em 6 estados Brasileiros (AM, SP, RO, MG, PE, PR). Foram solicitados, no total, 5 empréstimos das coleções de Pernambuco (herbário URM) e do Instituto de Botânica (herbário IBT) de São Paulo.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As análises moleculares foram feitas a partir dos espécimes das coleções de herbário e dos 5 espécimes coletados. Um pequeno pedaço do himenóforo foi retirado com auxílio de uma lâmina cortante, o qual foi armazenado em um tubo *eppendorf* com sílica, até o seu uso nos procedimentos moleculares.

Para elucidar as relações filogenéticas entre os espécimes coletados dentro do gênero *Agaricus*, utilizou-se o marcador molecular ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA nuclear (Zhao et al. 2016)

Para a extração de DNA dos materiais selecionados, foi utilizado o protocolo de Romano & Brasileiro (1998), adaptado para fungos (Anexo A).

Os produtos de extração foram diluídos numa concentração de 1:10 em água ultrapura milli-Q e, assim, utilizados na amplificação do segmento de rDNA ITS através dos primers ITS 6 e ITS 8 (Dentinger et al. 2010), seguindo o protocolo de Romano & Brasileiro (1998).

Para a amplificação da região do DNA foi utilizado o mix de PCR da marca ABM® e a receita seguiu as recomendações do fabricante. O programa utilizado no termociclador para as reações de PCR está especificado na Tabela 1.

Tabela 1: Protocolo do termociclo utilizado na reação de PCR para amplificação da região ITS do DNA

Regiões do DNA	Ciclos	Temperatura	Tempo
ITS	Desnaturação inicial	95 <sup>o</sup>	5 min
	35x	95	3 min
		61	30 s
		72	60 s
Extensão final	72	5 min	

A análise qualitativa dos produtos das amplificações foi realizada através da técnica de eletroforese. Em seguida os produtos da reação de amplificação foram purificados com PEG (polietilenoglicol), para eliminação dos reagentes utilizados na PCR. Posteriormente, as amostras amplificadas e purificadas foram encaminhadas para o sequenciamento na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no estado de Minas Gerais.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas manualmente através do programa Geneious V6.8. Foi montada uma matriz para o marcador ITS, contendo sequências geradas por este trabalho e algumas disponíveis no banco de dados online *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e *Plutof* (<https://plutof.ut.ee>). A matriz final contendo todas as sequências foi alinhada utilizando o software *Geneious* V6.8 com a estratégia de alinhamento global e algoritmo do próprio *software*, com direção única. Foram utilizados dois métodos de análise filogenética. A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada no programa RAXML v.8.0 (Stamatakis 2014), disponível na plataforma CIPRES Science Gateway

(phylo.org), utilizando o modelo GTRCAT e os parâmetros estimados pelo programa, os valores de suporte foram acessados através de 100 pseudoreplicações – *bootstrap* (BS).

Na análise de inferência Bayesiana as regiões 5.8S e ITS1/ITS2, foram consideradas separadamente. Para cada região o modelo evolutivo de melhor ajuste foi selecionado através do software JModelTest versão 2.1.6 (Darriba et al. 2012; Guindon & Gascuel 2003), utilizando como critério de seleção o AICc (*corrected Akaike Information Criterion*).

A Inferência Bayesiana foi realizada no programa Mr. Bayes v3.2.63 disponível na plataforma CIPRES Science Gateway, usando os modelos de substituição estimados anteriormente. Para a seleção da melhor árvore foram realizadas duas corridas com 4 cadeias independentes de 10 milhões de gerações cada, sendo amostradas a cada mil gerações. Das árvores amostradas foram descartadas 20% como *burn-in* e as árvores remanescentes foram utilizadas para cálculo da probabilidade posterior (PP) na árvore consenso.

Nos cladogramas gerados o valor de sustentação foi considerado satisfatório quando superior a 70% na análise de verossimilhança (BS) e superior a 0,9 na inferência Bayesiana

(PP).

A espécie *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc (KM248901) foi utilizada como grupo externo. Esse táxon representa o grupo *Bivelares*, uma seção que encontra-se no subgênero *Pseudochitonia* filogeneticamente distante da seção *Minores* de acordo Zhao et al. (2016).

A árvore filogenética gerada incluiu sequências de táxon da seção *Minores* e das seções *Arvenses* e *Laeticolores*.

As etapas de extração, amplificação e purificação, foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Botânica da UFSC. O sequenciamento das amostras foi realizado com o método Sanger na plataforma René Rachou (Fiocruz – Belo Horizonte MG) no âmbito do Projeto BrBOL (*Brazilian Barcode Of Life*).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região ITS foi amplificada com sucesso a partir dos cinco espécimes coletados em São Paulo. Outras 58) sequências da região ITS (Zhao et al. 2016; He & Zhao 2015) foram recuperadas do *GenBank* e também incluídas na matriz deste estudo.

### 4.1 ESTUDO DE CASO DE *AGARICUS DULCIDULUS*

Foram iniciados os procedimentos moleculares (extração, amplificação e sequenciamento de DNA) com os materiais coletados e os de herbário. No entanto, esses últimos não tiveram resultado satisfatório no sequenciamento. Uma das razões para isso pode ser a maneira que essas espécimes foram armazenados, principalmente pelo uso de naftalina em grande parte dos herbários brasileiros, técnica usada para evitar o ataque de insetos e fungos. Este composto degrada DNA, o que acaba dificultando o sequenciamento da região com qualidade (Hosaka & Kuniiko 2013). A degradação do DNA se dá ao longo do tempo, por isso a importância de se extrair o DNA o mais rápido possível, para que se evite perda (Hosaka & Kuniiko 2013).

Materiais incluídos nas análises: BRASIL, São Paulo: Caraguatuba Parque Estadual da Serra do Mar Núcleo

Caraguatatuba (MPD106; MPD 107; MPD108; MPD109; MPD110)

Material de referência: República Tcheca (KF447894)

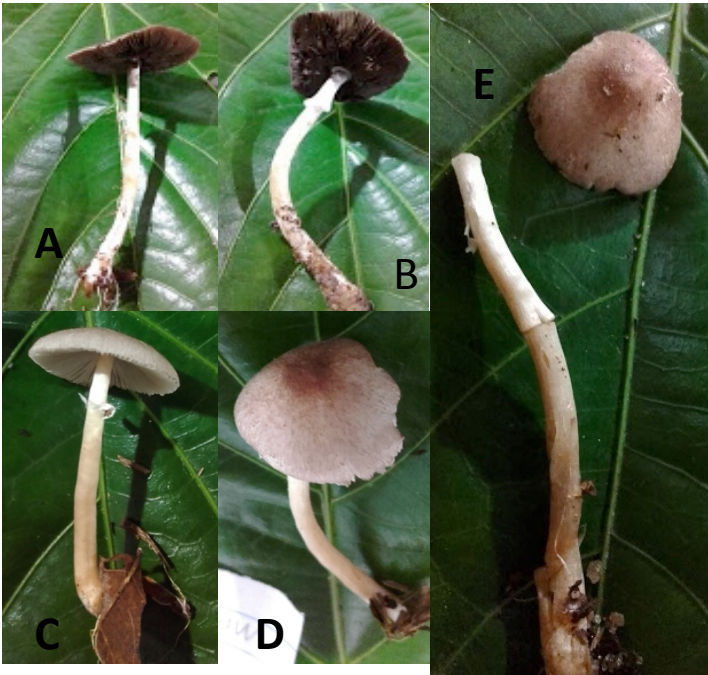
Inicialmente o objetivo deste estudo era fazer análise molecular do material de empréstimos de herbários de diferentes estados brasileiros, com o qual se construiria uma árvore filogenética com os espécimes coletados (Fig.1) macromorfológicamente semelhantes a *Agaricus dulcidulus* e o material para comparação, um espécime depositado em banco de dados virtuais, com o nome de *Agaricus dulcidulus* (KF447894), para esclarecer a problemática da nomeação equivocada de materiais descritos e depositados em bancos de dados online.

A escolha dos táxons para construir a árvore para esse estudo se baseou no trabalho de Zhao et al. (2016), que apresenta um estudo de reconstrução taxonômica do gênero *Agaricus*. Zhao et al. (2016) apresentaram novas seções dentro do gênero e esclareceram as relações filogenéticas entre elas. Como *Agaricus dulcidulus* está incluída na seção *Minores*, se utilizaram sequências de outras espécies desta seção incluídas no trabalho de Zhao e colaboradores, e alguns táxons de seções próximas filogeneticamente. Além desse estudo, se utilizou também o trabalho de He & Zhao (2015) que estuda



uma nova espécie dentro da seção *Minores*, e utiliza 20 táxons europeus e de outras partes do mundo.

**Fig.1:** Basidiomas de *Agaricus* sp. em campo, Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Caraguatatuba, SP. A: MPD107; B: MPD106; C: MPD109; D: MPD 108; E: MPD110 (Fotos: M. Drewinski).



## 4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS MOLECULARES

A árvore filogenética apresentada neste trabalho é a gerada por Inferência Bayesiana (Fig. 2) pois, apesar de as topologias geradas nas análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana serem congruentes, os ramos tiveram maior suporte na IB. Os valores de BS foram ajustados nos ramos da árvore de PP.

O alinhamento final da matriz de ITS resultou em 793 pares de base. O modelo evolutivo estimado para a região 5.8S foi JC, considerando igual frequência das bases (0,25) e taxas de substituição nucleotídicas (1,0). Para os espaçadores ITS1 e ITS2 foi selecionado o modelo SYM, com igual frequência de bases (0,25) e taxas de transição/transversão AC=0,63; AG=4,22; AT=1,13; CG=0,30; CT=4,37; e GT=1,00.

A hipótese de monofiletismo para a seção *Minoris* obteve valor de sustentação significativo na análise de IB (0,99) e insatisfatória na MV (49), já a seção *Arvenses* obteve valor máximo de sustentação em ambas as análises (IB = 1.00; MV = 100). Esses resultados são congruentes com os obtidos por Zhao et al. (2016) e He & Zhao et al. (2015).

O filograma apresentou baixos valores de sustentação em vários ramos, apesar de manter as seções *Minores*, *Arvenses* e *Laeticolares* em clados diferentes. O baixo valor de suporte é devido ao uso apenas do marcador ITS. Zhao et al. (2016) indicam o marcador ITS como sendo útil para ser utilizado em níveis taxonômicos ao nível de espécie e na relação entre grupos de espécies. A região ITS, no entanto é limitada quando se deseja inferir relações filogenéticas mais amplas, como observado para outros grupos de fungos.

Nas análises apresentadas, a seção *Arvenses* só se mantém monofilética se *Agaricus rufoaurantiacus* não for considerada, embora essa espécie seja parte da seção nas análises apresentadas por Zhao et al. (2016).

Quatro espécimes coletados em São Paulo formaram um clado com alto valor de sustentação (MPD107, MPD108, MPD109, MPD110), demonstrando pertencerem ao mesmo clado, dentro da seção *Minores*. Estas, no entanto, encontram-se filogeneticamente distantes de *Agaricus dulcidulus*, apesar da semelhança morfológica.

O filograma recuperado no presente trabalho separou *Agaricus purpurellus* de *Agaricus dulcidulus*, resultado

congruente com o trabalho de He & Zhao (2015) apesar de terem sido sinonimizadas ([indexfungorum.org](http://indexfungorum.org)).

Um dos espécimes coletados em São Paulo, MPD 106, ficou localizado na seção *Laeticolores* (ou seção desconhecida), com alto valor de suporte. O táxon mais próximo dessa sequência (*Agaricus* sp. LAPAM 14) foi coletado na República Dominicana. A hipótese para os dois compartilharem o mesmo ancestral recebeu valor máximo de sustentação em ambas as análises (IB e MV).

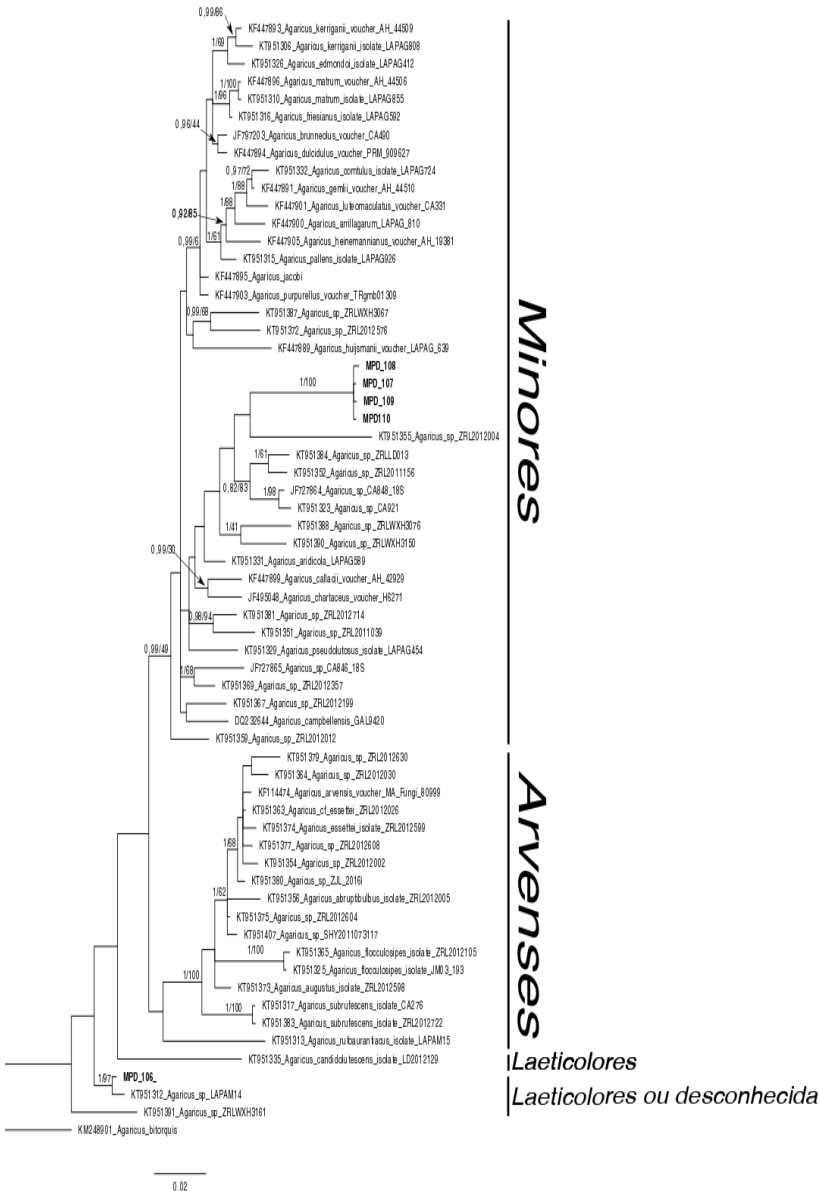


Figura 2. Árvore filogenética representada por 3 seções de *Agaricus*, gerada a partir do marcador ITS, com a topologia baseada na análise de Inferência Bayesiana. Os números nos ramos representam os valores de BS/ valores de PP. Os espécimes destacados em negrito representam as sequências geradas durante este trabalho a partir de espécimes coletados em São Paulo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Agaricus* tem sido amplamente estudado principalmente na Europa e mais recente na Ásia. Porém, apesar de ser um gênero com espécies bem conhecidas, ainda é pouco explorado em regiões tropicais e subtropicais. O objetivo desse trabalho foi trazer a problematização da nomeação errada de espécies brasileiras por se utilizar chaves de identificação europeia. Não existem especialistas deste gênero no Brasil, e isso faz com não existam chaves de identificação para táxons brasileiros, defasando a descrição dos espécimes coletados, pois frequentemente não se adequam com a descrição de membros de *Agaricus* que ocorrem em outros países.

Apesar *Agaricus dulcidulus* estar registrada no *Species link* com 13 representantes, resultado indicou que esta espécie não ocorre no Brasil. Da morfologia do que foi coletado no Brasil de espécimes semelhantes à *Agaricus dulcidulus* possivelmente inclui mais de uma espécie, não possivelmente relacionadas. Todavia, é necessária a inclusão de novos marcadores moleculares, como também, novas tentativas de sequenciamento de espécimes registrados com esse nome, em coleções de herbários brasileiros.

No entanto, um fator de destaque no presente trabalho foi dar ênfase à importância da curadoria dos materiais que foram e estão sendo incluídos em herbários e bibliotecas de sequência molecular. Além disso, não era uma prática comum extrair DNA dos materiais antes de desidratá-los, por isso a maioria dos espécimes armazenados em herbários brasileiros há mais tempo esteve em estado de manutenção que não é ideal e o material genético está degradado, o que dificulta os estudos de filogenia molecular.

A tentativa de se extrair DNA e sequenciar material de herbários neste estudo não foi bem sucedida principalmente por serem materiais relativamente antigos (o mais recente foi coletado em 2004) e possivelmente não foram bem conservados. Existem *kits* de extração que permitem ter um melhor resultado porém, o laboratório de Biologia Molecular onde esse trabalho foi desenvolvido não possuía de recursos financeiros para esse fim.

Drewinski e Neves (dados não publicados) coletaram espécimes de *Agaricus* em regiões de Mata Atlântica e, a partir de sequências de ITS e LSU de cerca de 70 espécimes, estimam que existam mais de 20 espécies a serem descritas, além de pelo menos duas novas seções dentro do gênero. Além das sequências geradas por Drewinski e Neves as análises filogenéticas incluíram dados de Zhao et al. (2016).

É evidente a grande diversidade do gênero no Brasil, e a necessidade de se ter mais especialistas neste grupo para aprimorar a descrição e identificação de espécimes e construir chaves de identificação a partir de táxons brasileiros. Apesar de existirem gêneros amplamente distribuídos como *Agaricus*, tem-se provado recentemente que a maioria das espécies de fungos não possui uma distribuição cosmopolita, e que os padrões de diversidade de espécies são influenciados por fatores biogeográficos, como o clima (Peay et al. 2016).

Por fim, este trabalho me ajudou a construir um conhecimento da importância da taxonomia e da sistemática, como também me permitiu conhecer novas técnicas em biologia molecular e saber o porque é necessário dar os nomes corretos para qualquer organismo, e como isso influencia na maneira que eu vejo a biodiversidade e a importância de sua conservação.



## REFERÊNCIAS

ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; NILSSON, R.H.; *et al.* 2010. PlutoF—a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research, with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 0;6:189-196.

ALBUQUERQUE, M.G; PEREIRA, A.B; CARVALHO, J.; ALVES, A. 2010. A família Agaricaceae Chevall. em trechos de Mata Atlântica da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil: Gêneros Agaricus, Cystolepiota e Lepiota. *Acta Bot. Bras*, v. 24, n. 2, p. 497-509.

BLACKWELL, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, 98(3): 426-438 .

BORTOLUS, A. Error Cascades in the Biological Sciences: The Unwanted Consequences of Using Bad Taxonomy in Ecology. 2008. *A Journal of the Human Environment*, 37(2):114-118.

BROCK, P.M.; HEIDI, D.; BIDARTONDO, M.I. 2009. How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytologist*, 181:719-742.

BRUNS, T.D.; FOGEL, R.; TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and Sequencing of DNA from Fungal Herbarium Specimens. *Mycologia*, Vol. 82, No. 2, pp. 175-184.

CHEN, J.; ZHAO, R.; KARUNARATHAN, S. 2012 *Agaricus megalosporus*: A New Species in Section *Minores*. *Cryptogamie, Mycologie*, 33 (2): 145-155.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.

DESTINGER, B.T.M.; MARGARITescu, S.; MONCALVO, J.M. 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources*, 10: 628-633.

DRÁBKOVÁ, L.; KIRSCHNER, J.; VLCEK, C. 2002. Comparison of Seven DNA Extraction and Amplification Protocols in Historical Herbarium Specimens of Juncaceae. *Plant Mol Biol Rep*, 20:161.

GEML, J.; GEISER, D.M.; ROYSE, D.J. 2004. Molecular evolution of *Agaricus* species based on ITS and LSU rDNA sequences. *Mycol Progress*, pp, 157- 176.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.

HAWKSWORTH, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12): 1422-1432.

HEINEMANN P. 1961. *Agarici Austro-Americani I: Agaricus of Trinidad*. *Kew Bull* ,15:231–248

HEINEMANN, P. 1977. Essai d'une cle de determination des genres *Agaricus* et *Micropsalliota*. *Sydowia* 30:6-37.

HE, M.O; ZHAO, R.L. 2015. A new species of *Agaricus* section *Minores* from China, *Mycology*, 6: 3-4,182-186.

HOSAKA, K.; KUNIIKO, U. 2013. Assessment of the DNA Quality in Mushroom Specimens: a Recovery of the Whole ITS Sequence from Fragmented DNA of the Type Specimen. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, 39 (2), pp.53-60.

KRAMER, L.A. 2004 The online auction color chart. Online Auction Color Chart Company, Stanford.

KALCHBRENNER. 1874. *Icon. Sel. Hymenomyc. Hung.* 29.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10<sup>th</sup> ed. CABI, Wallingford, UK, 771 pp.

LARGENT, D.L. 1986. *How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features*. 2<sup>a</sup> ed. Mad River Press Inc., Eureka, 166 pp.

NAUTA, M. M. 2001. Genus *Agaricus*. Pp. 64-151, In: Noordeloos, M.E.; Kuyper, TH.W.; Vellinga, E.C. *Flora Agaricina Neerlandica*, 5. Tokyo A.A. Balkema Publishers, Lisse, Abingdon, Exton (PA).

O'BRIEN, H.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M, VILGALYS, R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* Sep; 71(9): 5544-50.

OIANG, H. M.; ZHAO, R. 2015. A new species of *Agaricus* section *Minores* from China. *Mycology*, 6:3-4, 182-186.

PEAY, K.G; KENNEDY, P.G.; TALBOT, J.M. 2016. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology* ,14, 434–447.

Pegler, D. N. (1997) *The agarics of São Paulo: An account of the agaricoid fungi (Holobasidiomycetes) of São Paulo State, Brazil.* Royal Botanic Gardens, Kew. London, United Kingdom.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.CM. 1998. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 2(9): 40-43.

SMITH, B.E.; JOHNSTONJ, M.K.; LUCKING, R. 2016. From GenBank to GBIF: Phylogeny-Based Predictive Niche Modeling Tests Accuracy of Taxonomic Identifications in Large Occurrence Data Repositories. *Plos one*, 11(3).

Singer, R. (1986) *The Agaricales in modern taxonomy*, 4th edn. Koeltz, Königstein, Germany.

STAMATAKIS, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*.

WARTCHOW, F. 2005. A família agaricaceae fr. (Agaricales, Basidiomycota) em áreas de Mata Atlântica na região metropolitana de Recife – Pernambuco. Mestrado (Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

ZHAO, R.; KARUNARATHNA, S.; RASPÉ, O.; PARRA, L.A.; GUINBERTEAU, J.; MOINARD, M., DE KESEL, S.; BARROSO, G.; COURTECUISSÉ, R.; HYDE, K.D.; GUELLY, A.K.; DESJARDIN, D.E.; CALLAC, P. 2011. Major clades in tropical Agaricus. *Fungal Diversity*, 51: 279-296.

ZHAO, R.; ZHOUZ, J.L.; CHEN, J.; *et al.* 2016. Towards standardizing taxonomic ranks using divergence times – a case study for reconstruction of the *Agaricus* taxonomic system. *Fungal Diversity*, 78: 239.

## ANEXO A

Isolamento de DNA total de plantas utilizando-se o método CTAB de Romano & Brasileiro (1998) adaptado para fungos

1. Cortar um pequeno pedaço do basidioma (aprox. 15 mg) e o transferir para um almofariz contendo nitrogênio líquido. Com o auxílio de um pilão, pulverize o material até se obter um pó fino. 2. Transfira o pó obtido para um eppendorf de 2 mL que contenha 750  $\mu$ L de tampão CTAB\* pré-aquecido a 65oC. Feche o tubo e misture gentilmente até o pó ficar homogeneamente distribuído.
3. Adicione 4  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. Recomenda-se que esta etapa seja feita na capela devido à toxicidade do reagente. 4. Incube as amostras em banho-maria a 60oC por 30 min, agitando ocasionalmente o tubo para manter o extrato ressuspendido.
5. Retire o tubo do banho-maria e espere que a mistura atinja a temperatura ambiente. Adicione 750  $\mu$ L de clorofórmio:álcool isoamílico gelado (24:1; v/v). Feche o tubo e misture manualmente por 10 min. Recomenda-se que esta etapa seja feita na capela devido à toxicidade do reagente.
6. Centrifugue a 14.000 rpm por 10 min à temperatura ambiente, para separar a fase orgânica da aquosa.



7. Transfira a fase aquosa (fase superior) para um tubo novo de 1,5 mL e descarte o eppendorf antigo. Evite pegar qualquer proteína desnaturada presente na interface. Recomenda-se retirar 150  $\mu$ L por vez.

8. Repita a extração com clorofórmio:álcool isoamílico mais uma ou duas vezes (etapas de 5 a 7), levando em consideração que mais extrações podem tornar a amostra mais pura, porém com maiores perdas de DNA.

9. Adicione 450  $\mu$ L de isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Misture suavemente até formar um precipitado. Deixar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 1 h. 10. Centrifugue a amostra a 10.000 rpm por 20 min. Em uma boa preparação, o DNA não deve estar escuro.

11. Descarte o sobrenadante e lave o precipitado com 450  $\mu$ L de etanol 70% (v/v).

12. Centrifugue novamente a 14.000 rpm por 3 min.

13. Descarte o sobrenadante e seque o precipitado pela borda do eppendorf. Coloque o tubo em banho-maria seco a  $35^{\circ}\text{C}$  até secar totalmente.

14. Dissolva o precipitado em 50  $\mu$ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e incube a  $4^{\circ}\text{C}$  (geladeira) por

meia hora ou mais. A amostra pode ser então armazenada a -20oC (freezer).

\*Tampão CTAB

CTAB 2% (p/v)

NaCl 1,4 M

Tris-HCl 100 mM pH 8,0

EDTA 20 mM