

DO TESTE DE PATERNIDADE À ARTE DE IDENTIFICAR FUNGOS: A PESQUISA DESDOBRADA EM MATERIAL DE ENSINO E DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Lucia Maria Paleari¹
Eduardo Bagagli²
Mariana Fernandes²

[...] A ciência é muito simples. Quando se torna complicada, em geral é porque o mundo é complicado - ou porque nós é que somos complicados. Quando nos afastamos assustados da ciência, porque ela parece difícil demais (ou porque não fomos bem ensinados), abrimos mão de cuidar do nosso futuro. (SAGAN, 2006, p. 47)

Resumo. Com o objetivo de possibilitar que alunos do Ensino Médio e de graduação em Ciências Biológicas adquiram conceitos básicos da biologia molecular, para compreensão de diversos assuntos taxonômicos, evolutivos e da investigação criminal, apresentamos resultados inéditos de uma pesquisa interdisciplinar para identificação de um fungo fitopatígeno, por meio de uma narrativa que contextualiza, ao longo da história, as construções teóricas que possibilitaram esse avanço.

Palavras-chave: Ensino de Biologia; Fungo fitopatígeno; Biologia molecular; Reação em Cadeia da Polimerase; *Golovinomyces* sp.

Introdução

Com uma população infanto-juvenil incapaz de compreender o que lê ou de traduzir pensamentos em textos bem elaborados, assim como de compreender assuntos científicos (BRASIL, 2012, ANUÁRIO BRASILEIRO DA EDUCAÇÃO BÁSICA, 2013) ficamos à mercê de desempenhos profissionais de baixa qualidade nos mais diversos setores de prestação de serviços e nos deparamos com pessoas incapazes de compreender fenômenos da Natureza e de assumir comportamentos sociais e biologicamente saudáveis. Por outro lado, como aspirantes ao ensino universitário e como alunos de graduação, esses jovens têm-se revelado sem o devido preparo para acompanhar conteúdos específicos e para compreender e dimensionar o sentido e a importância de fazer ciência.

Confrontados com essa realidade, Machado (2008) e seus colaboradores incorporaram a um projeto de pesquisa envolvendo Botânica, Ecologia e Educação, o desafio de produzir materiais didáticos e de divulgação científica, para tratar de fundamentos das Ciências Físicas

¹ Departamento de Educação, Instituto de Biociências CP 510 - UNESP CEP 18618-000 Botucatu

² Departamento de Microbiologia, Instituto de Biociências CP 510 - UNESP CEP 18618-000 Botucatu

e Biológicas, ampliando a percepção e questionamentos sobre a realidade, uma vez que “a iniciação precoce à ciência é salutar, pois ela dá acesso, desde o início da vida humana, à inesgotável riqueza do espírito científico, baseado no questionamento, na recusa de qualquer resposta pré-fabricada e de toda certeza em contradição com os fatos” (NICOLESCU, 1999). Com base nesses pressupostos, objetivou-se divulgar resultados inéditos de uma parte da pesquisa interdisciplinar, de forma a desenvolver conceitos básicos de biologia molecular, que são imprescindíveis ao entendimento de certos temas e procedimentos, como, por exemplo, o teste de paternidade. Assim como tantos outros assuntos, esse teste acabou tão banalizado quanto inacessível do ponto de vista da compreensão dos seus fundamentos científicos. Grande parte da população que o evoca em conversas corriqueiras, o faz quando há questões práticas sobre relações de paternidade que se deseja elucidar. Portanto, pretendemos com este trabalho, contextualizando a investigação realizada e seus objetivos, descrever procedimentos e resultados, introduzindo as bases teóricas e aspectos históricos que lhes dão sentido, para que estudantes, do ensino médio e graduandos, apropriem-se dos conceitos e com eles possam avançar para a compreensão de diversos assuntos taxonômicos, evolutivos e da investigação criminal, por exemplo, que podem ser investigados do ponto de vista da biologia molecular.

Interações biológicas e interdisciplinaridade

Com base na visão reducionista, que marcou a maneira de pensar e fazer ciência a partir do século XVII, permitindo aprofundar o conhecimento das partes, foram possíveis grandes avanços na compreensão da Natureza e na produção de aparatos tecnológicos. No entanto, a cada dia se faz mais necessário, como esclarece Nicolescu (1999), que adotemos abordagens abrangentes, transdisciplinares, se quisermos avançar em direção à compreensão de propriedades e padrões, que emergem do conjunto complexo de interações que compõem os sistemas. Com esse propósito, Machado (2008) e seus colaboradores iniciaram o trabalho de investigação do papel das estruturas glandulares existentes na planta ruderal, *Croton glandulosus* (Figura 1). Ao atrair e disponibilizar alimento a inúmeros artrópodos, elas proporcionam também condições para o estabelecimento de interações indiretas, de parasitóides e predadores, que contribuem para que se estabeleça um complexo sistema, cuja configuração é dependente da natureza das interações entre os envolvidos e do que delas emana (artigos em preparação sobre esses aspectos). Qual o padrão de organização e qual a tendência do sistema, em razão das pressões recíprocas exercidas pelos seus integrantes, sob certas condições abióticas, são questões que se tem buscado responder à luz de conhecimentos e interpretações que transcendem limites disciplinares. São processos anatomo-funcionais

criativos, que coevoluem e possibilitam a coexistência dos seres vivos de diferentes níveis tróficos.



Figura 1 – *Croton glandulosus*: Planta em um gramado (à esquerda) e ramo sadio com abelha coletando néctar floral (à direita).

Nessa linha de entendimento, procuramos conduzir nossas investigações. Em dado momento dessa caminhada, deparamo-nos com um fungo fitopatológico, que, ao atacar indivíduos de *Croton glandulosus*, possibilitou o estabelecimento de outras interações, que tornaram o sistema ainda mais complexo e desencadearam novos questionamentos. Alguns resultados dos estudos dessas interações ecológicas já foram divulgados (<http://www.projetocroton.blogspot.com.br/2015/03/croton-glandulosus-fungo-parasitico-e.html>). Porém, restava investigar como o fungo interagiu com a planta e identificá-lo do ponto de vista taxonômico. O detalhamento dos passos e resultados desse processo de investigação para a identificação científica do fungo fitopatológico, é o que será apresentado neste artigo. Dessa forma, pretendemos tratar de fundamentos da biologia molecular e alcançar o objetivo proposto e apresentado no início deste artigo.

O fungo fitopatológico de *Croton glandulosus*

Na cidade de Botucatu, SP, é comum nos meses de outono-inverno encontrar folhas, ramos e frutos de *C. glandulosus* tomados pelo fungo fitopatológico causador da doença conhecida por oídio (Figura 2). Em outras cidades do estado de São Paulo isso também acontece. Além de *C. glandulosus*, diversas espécies de plantas, inclusive plantas cultiváveis

como o quiabeiro, mamoeiro e curcubitáceas podem ser acometidas por oídeo, no entanto, nem sempre devido à mesma espécie de fungo.



Figura 2 – Ramo de *Croton glandulosus* tomado por fungo fitopatogênico, que serve de alimento ao besourinho *Psyllobora gratiosa*.

Genericamente, esse fitopatogênico que acomete o *Croton glandulosus* pode ser denominado *Euoidium* sp. (= *Oidium* sp.). Porém, em estudos científicos é de fundamental importância identificar a espécie, associando-a a suas características peculiares. Para isso, são necessárias observações rigorosas de sua fase sexuada, com descrições das suas estruturas reprodutivas, conhecidas por corpos de frutificação, e de diversas outras características morfológicas. Trata-se de trabalho exaustivo e que requer um micologista experiente para executá-lo, infelizmente um profissional raro, difícil de ser encontrado disponível.

Outro aspecto importante, que dificulta o estudo e a identificação desses fungos, é o fato de não se conseguir cultivá-los em laboratório, em meios de cultura. Isso porque eles só se desenvolvem associados a seus hospedeiros vegetais, razão de serem denominados organismos biotróficos obrigatórios. Normalmente, uma interação assim é resultado de longo processo coevolutivo, isto é, um processo de mudanças recíprocas ao longo do tempo, entre o fungo e a planta.

Portanto, se quiséssemos conhecer, em meio a 900 espécies já descritas, a espécie que infesta o *Croton grandulosus* causando-lhe o oídio, precisaríamos da ajuda de um

micologista. E assim acontecia, até certos avanços científicos-tecnológicos mais recentes. Esses avanços, fruto da incansável busca do Homem para entender fenômenos da Natureza e para resolver questões práticas, levaram-no ao desenvolvimento de técnicas sofisticadas na área de biologia molecular. Muitas dessas técnicas baseiam-se na identificação de partes constituintes do DNA, que permitem saber de que espécie de fungo se trata sem analisar as estruturas reprodutivas, típicas da fase sexuada. E é disso que iremos tratar neste artigo.

Mas, para conseguir lançar mão dessas técnicas de biologia molecular e identificar o fungo em questão, além do material genético dele, ou de qualquer outro organismo a ser estudado, precisa-se de certos conhecimentos fundamentais de biologia.

Imaginando que a maioria das pessoas que lerão essa matéria não será de especialistas no assunto, decidimos inicialmente reunir aqui certos conhecimentos básicos que certamente, facilitarão muito a compreensão do processo de identificação e das grandes percepções de pesquisadores que foram responsáveis por tantos avanços tecnológicos.

Tateando no escuro

Hoje é comum ouvir-se pessoas usando o termo DNA. No entanto, muitas delas, apesar de não saberem o significado dessa sigla, conhecem bem o poder do teste de DNA, famoso por permitir elucidar questões de paternidade. Mais recentemente, e não com tanta frequência, noticia-se que pesquisadores conseguiram identificar de quem são ossadas encontradas no ambiente, seja para elucidar crimes ou para conhecer melhor ancestrais de animais obtidos em escavações paleontológicas. Fósseis de plantas também podem ser identificados e estudados no contexto das linhas de parentesco entre os diversos grupos.

Porém, nem sempre a humanidade desfrutou de tanta tecnologia para resolver certas questões ou para facilitar investigações sobre os seres vivos, muito pelo contrário. Basta relembrar que alguns grupos de pessoas só souberam que todos os seres vivos são constituídos de pequenas unidades, que foram denominadas de células, na segunda metade do século XVII, após a fabricação do microscópio, que permitiu enxergar bem além da capacidade natural de nossos olhos (RONAN, 1987). O reconhecimento das células como unidades básicas, constituinte de todos os seres vivos, em 1838, aconteceu com Matthias Jakob Schleiden e Theodor Schwann, que receberam o crédito pela Teoria Celular (MASON, 1964).

Enquanto as descobertas sobre as células eram detalhadas, à medida que os microscópios eram aperfeiçoados, outros estudiosos procuravam entender como se dava a transmissão de características hereditárias, que interessavam sob dois aspectos: o teórico, que diz respeito ao entendimento da estrutura e funcionamento dos seres vivos, e o prático, que

diz respeito ao melhoramento dos descendentes de animais e vegetais, com vistas à obtenção de indivíduos mais resistentes ou produtores de maior quantidade de alimentos, por exemplo.

Uma novidade que revolucionou a Biologia

Até meados do século XX ficamos sabendo que as informações hereditárias são transportadas nos cromossomos, e que eles se encontram no citoplasma de bactérias, células procariontas, ou reunidos no interior do núcleo de células eucariotas (animais, vegetais e fungos), e que eles podem ser duplicados e posteriormente repartidos entre células filhas, quando crescemos ou repomos células perdidas. Ficamos sabendo também que quando as células reprodutoras são formadas elas recebem apenas metade do lote de cromossomos da sua respectiva espécie e que o lote total será recomposto no descendente, quando o gameta masculino se unir ao gameta feminino na reprodução.

No entanto, foram os dados do estudo do zoólogo James D. Watson e do biofísico Francis Crick (WATSON e CRICK, 1953), que revolucionaram nosso conhecimento e possibilitaram a elaboração de explicações sobre as etapas do processo de síntese proteica, por exemplo, e o desenvolvimento de técnicas sofisticadas para estudos moleculares, como aquelas utilizadas atualmente para realizar o conhecido teste de DNA.

Esses pesquisadores propuseram que o material hereditário DNA, o Ácido Dexoxirribonucleico, seria

composto por duas fitas retorcidas (dupla hélice), constituídas por uma sequência de unidades moleculares denominadas de nucleotídeos (Figura 3).

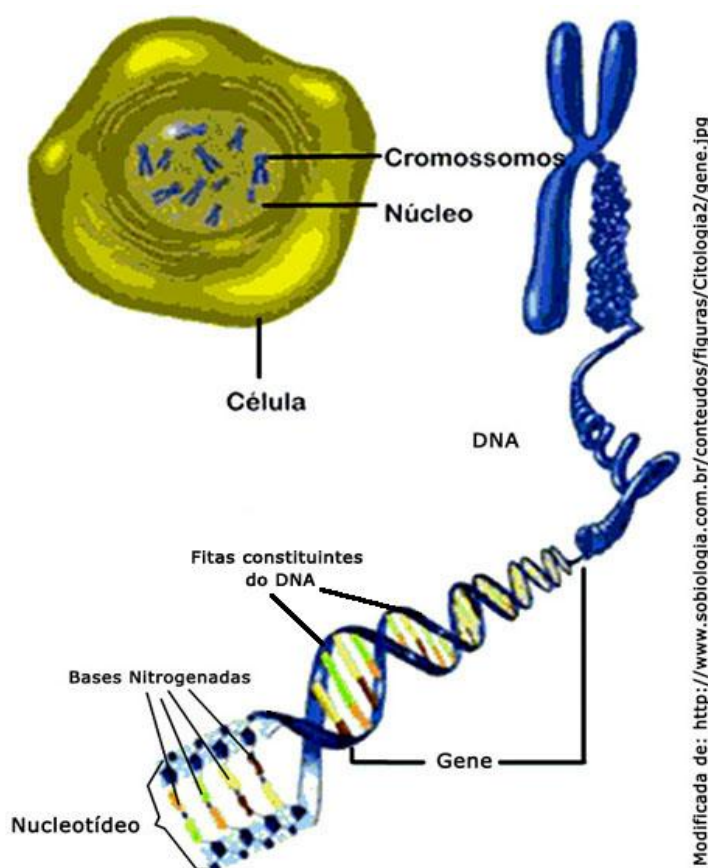


Figura 3 - Esquema de uma célula com núcleo contendo cromossomos, com um deles ampliado para mostrar detalhes da estrutura do DNA.

Como se pode perceber na imagem da figura 3, cada nucleotídeo é composto de unidades menores como as bases nitrogenadas, cujas estruturas estão detalhadas na figura 4.

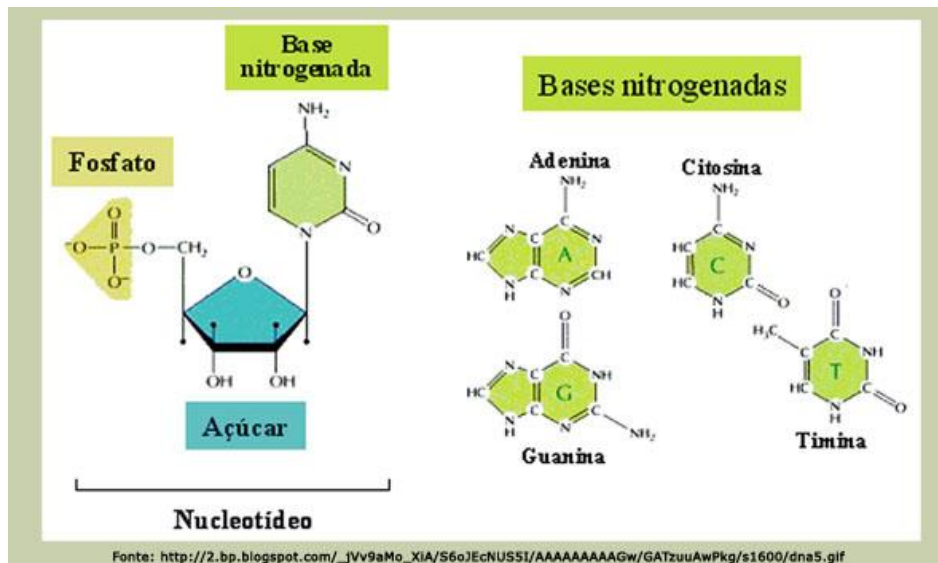


Figura 4 - Detalhes da estrutura de um nucleotídeo, composto por 3 unidades (fosfato, base nitrogenada e açúcar) e das bases nitrogenadas (A = Adenina; C = Citosina, G = Guanina; T = Timina), que podem fazer parte dele

Modelo adequado, explicações simples

Esse modelo do DNA, proposto por Watson e Crick, é tão excepcional, que, entre outras coisas, permite compreender, com facilidade, como é possível saber a que organismo um DNA pertence. Basta para isso, saber que cada ser vivo tem uma sequência própria de nucleotídeos, portanto, tem uma sequência própria de bases nitrogenadas (T, C, G, A). De uma maneira simplificada, podemos imaginar, por exemplo, que a sequência de bases — AATGCCATTGGATT — pertence a uma espécie "A". Se nos depararmos com outra sequência, como — AATGGGATTGGATT —, poderemos dizer que ela pertence a outra espécie, "B", por exemplo, dado que a sua sequência de bases difere da anterior, em duas delas, indicadas em amarelo na representação a seguir:

AATG**CC**ATTGGATT — espécie "A"

AATG**GG**ATTGGATT — espécie "B"

É claro que se investigarmos um trecho curto do DNA dessas mesmas espécies, portanto, com poucas bases, serão grandes as chances de detectarmos a mesma sequência de bases no DNA da espécie "A" e no DNA da espécie "B". Conseqüentemente, concluiremos

que o DNA da espécie “A” e o DNA da espécie “B” são de uma única espécie, como mostra o exemplo a seguir.

Espécie "A" - AATG

Espécie "B" - AATG

Porém, à medida que investigarmos a sequência de bases de um trecho grande ou muito característico do grupo investigado, as chances de identificarmos corretamente o organismo serão maiores e o resultado tornar-se-á confiável. Poderemos, assim, assegurar o resultado, garantir que ele merece crédito.

O teste de paternidade

A existência de uma sequência de bases nitrogenadas única para cada indivíduo, e que será tanto mais parecida à de outro quanto maior for o parentesco entre eles, é um dos conhecimentos que se leva em consideração no teste de paternidade.

O outro conhecimento importante para entender os resultados desse teste tem a ver com a divisão celular e reprodução. Sabemos que cada gameta masculino (espermatozoide) tem a metade do lote de cromossomos da sua espécie e que cada um deles tem a sua respectiva sequência de bases semelhante à do pai, assim como cada gameta feminino (óvulo) tem a metade do lote de cromossomos e que cada um deles tem a sua respectiva sequência de bases semelhante à da mãe. Portanto, quando os gametas masculino e feminino se unirem na reprodução, a célula que se formará, e que dará origem ao descendente, terá trechos dos cromossomos com sequências de bases nitrogenadas iguais ou muito semelhantes às sequências de trechos do DNA do pai e sequências semelhantes a trechos do DNA da mãe. Todas as células do corpo desse indivíduo filho serão assim, porque elas se originam da célula ovo inicial, que se multiplica em inúmeras outras semelhantes, seja para promover o crescimento do corpo ou a reposição de células perdidas. Por isso, ao investigarmos a sequência de bases nitrogenadas de uma amostra de DNA de um suposto filho e compararmos com uma amostra de DNA do suposto progenitor, o grau de semelhança da sequência de bases dos dois (supostos filho e progenitor), deverá ser muito grande, quase 100%, para podermos atestar que se trata, seguramente, de pai e filho. Só assim o teste será confiável. Quanto mais trechos de DNA forem comparados entre supostos pai e filho, mais confiabilidade terá o teste realizado.

Alguém atento a detalhes poderia se perguntar:

Mas o DNA não é composto por duas fitas? Qual delas, então, teremos de usar para fazer a comparação?

A resposta é simples, porque o modelo proposto por Watson e Crick, como já foi escrito acima, além de excepcional, é também relativamente simples. Segundo ele, cada base nitrogenada de uma fita do DNA é capaz de se parear e manter-se ligada a certa outra e específica base nitrogenada. Isso significa, que quando houver um nucleotídeo composto pela base Timina na fita 1 da dupla hélice, na mesma posição da fita 2 entrará uma base Adenina de outro nucleotídeo, para parear e se ligar àquela Timina da fita 1 e vice-versa. Da mesma forma, Citosina só pareia com Guanina e vice-versa. Por isso, dizemos que uma das fitas de uma dupla hélice é sempre complementar da outra. Isso significa também que se conhecermos uma das fitas, poderemos saber qual é a sequência de bases da outra.

Imaginemos agora que essas fitas que estão ligadas por meio das bases e torcidas de acordo com o modelo de dupla hélice se separassem em um ambiente contendo um grande número de nucleotídeos com os quatro tipos de bases disponíveis. Seria possível construir, a partir de cada uma das fitas da dupla hélice, as suas respectivas fitas complementares?

Pois muito bem, isso é o que acontece no interior de uma célula quando ela vai se multiplicar, porque precisará fazer uma cópia de todos os cromossomos, para poder enviar um lote completo deles para cada célula filha, em se tratando de célula somática. Se a célula for originar gametas, também precisará duplicar o lote de cromossomos, só que, neste caso, o lote duplicado será repartido em quatro, originando quatro células reprodutoras.

É claro que há diversos detalhes nesse modelo explicativo criado pelos cientistas, como, por exemplo, a necessidade de uma substância denominada de enzima DNA polimerase, sem a qual um nucleotídeo não pode se ligar ao anterior e ao subsequente, formando uma cadeia. No entanto, o princípio do modelo explicativo é simples de compreender.

Esse mesmo processo, realizado naturalmente pelas células, já pode ser realizado em laboratório, graças aos avanços tecnológicos proporcionados por ideias geniais — e simples, é claro! —, que atualmente fazem parte de procedimentos rotineiros em laboratórios nos quais se trabalha com sequenciamento de DNA e identificação molecular de espécies.

Etapas a vencer para a identificação do fungo de *Croton glandulosus*

Após reunir esses conhecimentos e ideias básicas que possibilitaram o desenvolvimento das técnicas da biologia molecular, podemos voltar à identificação do fungo

de *Croton glandulosus*, apresentando os procedimentos que adotamos e esclarecendo detalhes interessantes das técnicas utilizadas.

Ao decidirmos identificar o fungo causador do oídio em *Croton glandulosus*, o primeiro passo foi coletá-lo, para extrair dele o DNA: DNA nuclear, localizado no núcleo, e DNA mitocondrial, existente em uma organela do citoplasma, a mitocôndria, que é responsável pela produção de energia durante a respiração celular.

Para isso, visitamos uma área ruderal onde havia muitos pés da planta com ramos atacados. Diversos deles foram coletados, acondicionados em sacos de plástico e transportados ao Laboratório de Biologia de Fungos do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP. No laboratório, o material esbranquiçado, composto de finos fios que estavam se desenvolvendo nas folhas da planta, o micélio composto de inúmeras hifas, foi raspado cuidadosamente com um bisturi e introduzido em microtubos apropriados. Nesses microtubos, onde havia pequenas esferas de sílica, que é o mesmo material que compõe os grãos de areia, havia também uma solução denominada tampão de extração. Essa solução tampão contém diversas substâncias, que auxiliam na solubilização e preservação das fitas de DNA existente nas células do fungo.

Depois disso, os microtubos foram agitados vigorosamente em equipamento apropriado de laboratório, para provocar o rompimento das células e liberação do DNA nuclear e mitocondrial do fungo, naquele meio líquido.

O passo seguinte foi escolher a região mais adequada do DNA para fazer a identificação molecular da espécie, escolha que recaiu sobre aquela que contém os genes codificadores de RNA ribossômico.

Mas, por que, para fazer a identificação molecular das espécies de fungos, trabalha-se com essa região do DNA e não com outras? Por que com essa região que contém os genes responsáveis pela transformação da mensagem neles contida, em moléculas dos RNAs componentes dos ribossomos, que são estruturas citoplasmáticas envolvidas na síntese de proteínas?

Conservação e mutação: Uma chave para o quebra-cabeça

Depois de muitos estudos, pesquisadores descobriram que esses genes codificam três RNAs ribossômicos, o 18S, 5.8S e 28S, que são importantíssimos na organização dos ribossomos. Descobriu-se também, que são três genes altamente conservados ao longo do tempo, por isso, com pouquíssimas variações na sequência das unidades constituintes do DNA, os nucleotídeos.

Mesmo espécies de fungos pouco aparentadas entre si, têm essas três regiões semelhantes. Sendo assim, esses três genes não permitem diferenciar espécies. No entanto, se considerarmos as demais categorias taxonômicas, poderemos dizer que fungos de uma mesma Família, apresentam essas regiões com grau maior de semelhança do que fungos que pertencem a Ordens ou Classes diferentes, por exemplo.

Quando ocorrem mutações nessas regiões biologicamente importantes, elas tendem a ser eliminadas por seleção natural, que neste caso é denominada de seleção estabilizadora ou seleção purificante.

Ora, se essas regiões são semelhantes em todos os fungos, como se explica serem escolhidas para identificá-los, espécie por espécie?

Por uma razão simples. Veja a fita de DNA representada na figura 5. Note que intercalando os genes que codificam os RNAs 18S, 5.8S e 28S, estão duas outras regiões: ITS1 e ITS2 ou Espaçadores Internos Transcritos 1 e 2.

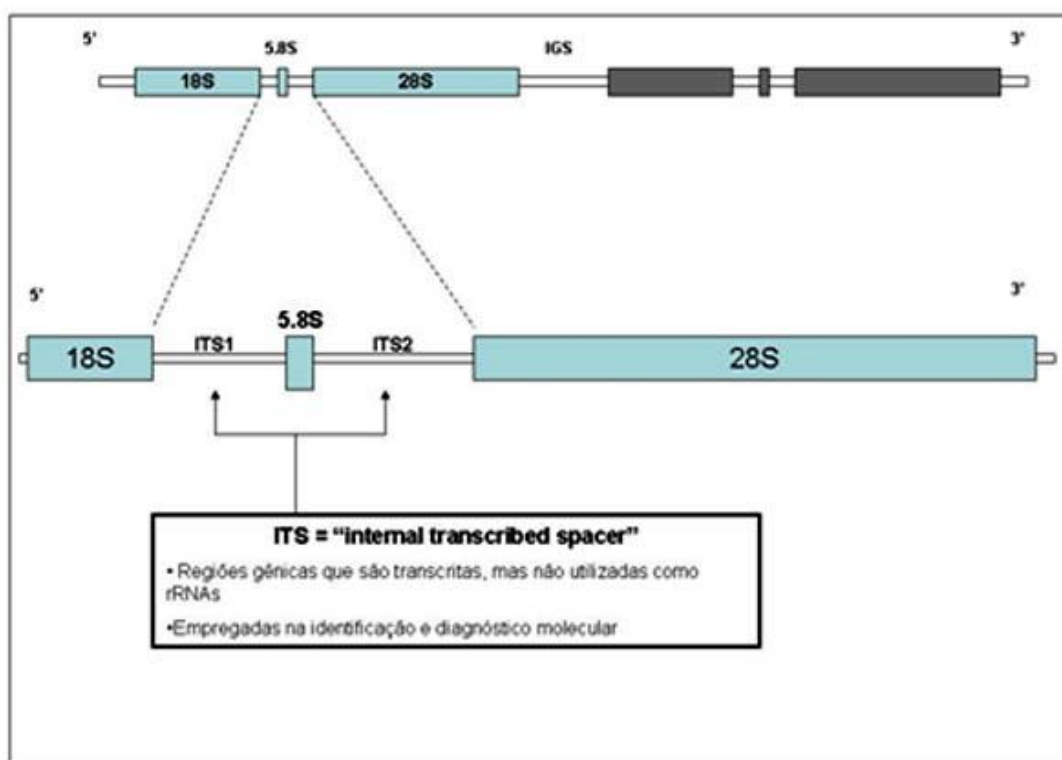


Figura 5 – Organização gênica do DNA codificador dos RNAs ribossômicos (RNAr) 18S, 5.8S e 28S e das duas regiões espaçadoras internas (ITS1 e ITS2). Adaptado de Bagagli & Marques (2010).

Embora não se saiba quais as funções dessas duas regiões, se é que existem, sabe-se que estão localizadas entre os três tipos de RNAs ribossômicos e que são variáveis, mesmo entre espécies filogeneticamente próximas, isto é, espécies bastante aparentadas. Isso faz com

que cada espécie tenha essas regiões estruturadas de forma distinta das demais espécies. Por essa razão, ITS1 e ITS2 são consideradas regiões espécie-específicas e podem ser utilizadas para identificação de espécies.

A grande sacada ou o grande *insight*

De forma simples e criativa, os cientistas moleculares tiraram proveito dessa rara combinação, para uso na identificação molecular de fungos. Foi um processo trabalhoso, que reuniu resultados de diversas pesquisas, até poder-se chegar à aplicação prática desses conhecimentos. Porém, as ideias fundamentais são de fácil entendimento. Vejamos, pois.

Sabendo que as regiões ITS1 e ITS2 são espécie-específicas, funcionando, portanto, como um código de barras (*barcoding*), seria preciso descobrir qual a sequência das bases nitrogenadas que compõe a sua estrutura, para saber a que espécie pertence.

Por outro lado, as regiões conservadas, 18S e 28S, por apresentarem longos trechos cujas sequências de nucleotídeos, com suas respectivas bases nitrogenadas, são praticamente idênticas em todos os fungos, permitiriam detectar certa sequência de bases para, em laboratório, produzir a sequência complementar, com a qual se iniciaria o processo de produção do trecho do DNA no qual estão ITS1 e ITS2 e identificar aquela espécie de fungo.

As respectivas sequências de bases complementares às extremidades conservadas 18S e 28S, de cada fita de DNA, que passaram a ser produzidas em laboratório para dar início ao processo de produção do trecho complementar de DNA, têm em torno de 20 bases e é o que se denomina de *primers* conservados ou sequências iniciadoras.

Essas sequências iniciadoras são, portanto, capazes de parear (anelar) com a sequência complementar do trecho conservado de qualquer espécie fúngica, proporcionando assim condições para a amplificação do DNA, isto é, replicações da região gênica de interesse. Isso acontece por meio de um processo denominado de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), inventado por Kary Mullis, ganhador do Prêmio Nobel de química em 1993. Como já aconteceu com diversos outros pesquisadores que tiveram ideias brilhantes, responsáveis por descobertas revolucionárias, inicialmente ignoradas por colegas editores de revistas científicas e de livros, o reconhecimento de Kary Mullis não foi imediato. Seu trabalho foi rejeitado pela *Nature e Science*, duas importantes revistas científicas. Não fosse a determinação de Mullis, que o levou a procurar por uma terceira e menos influente revista, *Methods in Enzymology*, e a perspicácia de um editor, sua fantástica descoberta ficaria engavetada por mais tempo.

Bem, a ideia de Mullis foi relativamente simples, mas para conseguir atingir o alvo, isto é, amplificar um determinado trecho de DNA contendo o *barcoding* seria preciso detectá-lo. No caso do *Euoidium* sp. teríamos de detectar o trecho onde se inserem as regiões ITS.

Como então, conseguir esse feito?

Descobrimo a localização da região "código de barras" (*barcoding*) de um fungo

O primeiro passo seria a desnaturação do DNA, separando as duas fitas que compõe sua estrutura. Isso é conseguido por meio de alta temperatura, que está por volta de 94°C. Separadas as fitas, seria preciso detectar a extremidade inicial do trecho de DNA, da espécie de ser vivo que se quer identificar. Para isso, seria preciso colocar junto às fitas de DNA, o *primer* conservado, cuja sequência de bases é complementar às bases da extremidade inicial do trecho de interesse do DNA da espécie que se quer identificar. Esse segmento de bases, o *primer* conservado, ao "reconhecer" seu complemento e com ele parear, identificaria o início do trecho a ser copiado por diversas vezes.

Bingo! Assim detectou-se o início do trecho que contém as regiões ITS1 e ITS2, como mostra a imagem da figura 6.



Figura 5 - Ácido Desoxiribonucleico (DNA) com as suas duas fitas complementares distendidas (fita 1 e fita 2) e cada uma delas com a sequência iniciadora ou *primer* correspondente (trecho em azul); as setas indicam o segmento que será replicado (amplificado).

Havendo nucleotídeos compostos pelas quatro bases nitrogenadas (T, C, G e A) soltos no mesmo meio ocupado pelas fitas de DNA e os *primers*, seria possível iniciar o processo de produção da sequência complementar de DNA, ligando uma base à outra. Dessa forma, cada trecho de interesse em cada fita de DNA serviria de molde para novo trecho de estrutura complementar, como se pode observar na figura 7.



Figura 7 - Ácido Desoxiribonucleico (DNA) com as suas duas fitas complementares distendidas e os respectivos segmentos espécie-específicos (*barcoding*) duplicados a partir de seus iniciadores (*primers*) correspondentes (em azul). Observe que o iniciador 1 faz crescer o segmento complementar à fita 1, da esquerda para a direita e o iniciador 2 faz crescer o segmento complementar à fita 2, da direita para a esquerda.

E foi exatamente isso o que se conseguiu.

É importante destacar dois pontos.

Um deles, é que os respectivos segmentos espécie-específicos (*barcoding*), que foram duplicados a partir de seus iniciadores (*primers*) correspondentes, podem ser maiores, mais longos do que foram representados na figura 7, se houver tempo para que os pareamentos continuem, mas serão sempre menores do que os moldes.

O outro ponto importante, é que com a repetição desse processo, as fitas complementares, que são menores do que as fitas 1 e 2, também servirão de molde para a produção de novas fitas complementares a elas. Portanto, ao final do processo de produção de fitas complementares, haverá no meio quantidade proporcionalmente maior desses trechos mais curtos.

É provável que alguém que não seja dessa área de estudos, ainda se pergunte:

Como é que os nucleotídeos, com as respectivas bases pareando-se a suas complementares das fitas de DNA, se ligam uns aos outros, em sequência, processo que é chamado de polimerização?

Ou ainda:

Como é que se sabe ao final, quais são as bases (T, C, G, A) que estão em cada local das fitas de DNA? Isto é, qual a sequência em que elas se encontram, uma vez que são invisíveis aos nossos olhos?

Essas são perguntas muito pertinentes, porque sem esses esclarecimentos, o que foi apresentado fica parecendo mágica, impedindo-nos de entender e de acreditar em tudo o que foi visto até aqui. Então, nada mais justo do que esclarecer as dúvidas, sem deixar de lembrar, que todas essas explicações e os modelos utilizados para isso, como desenhos, equações matemáticas ou modelos moleculares são frutos da imaginação humana na tentativa de dar sentido ao que acontece ao nosso redor, sejam fenômenos visíveis aos olhos ou não, palpáveis ou não, mas que de alguma forma conseguimos detectar, seja por meio dos nossos sentidos ou de aparelhos apropriados.

O interessante, nessa maneira de explicar tudo o que se passa ao nosso redor, é que após diversos testes para verificar se as explicações (hipóteses) são ou não procedentes, elas só são mantidas se resistem aos testes. Portanto, se continuam servindo bem e de forma coerente, para explicar os fenômenos, passam a fazer parte do conhecimento sobre a Natureza, que foi batizado de Conhecimento Científico.

Enfim, a técnica revolucionária!

Para identificar um fungo, vimos que é preciso ter, em um mesmo recipiente, o trecho do DNA pertencente a esse fungo, que será amplificado, isto é, do qual serão produzidas diversas cópias; ter os *primers*, que são as sequências iniciadoras, e ter também muitos nucleotídeos. Em laboratório, uma solução contendo esses materiais será colocada em microtubos. Porém, para que o processo aconteça e as bases nitrogenadas se pareiem com suas complementares, que estão nas fitas de DNA, é preciso existir uma enzima, que é um tipo de proteína, denominada de DNA polimerase. É essa enzima que, funcionando bem em temperaturas elevadas, cerca de 72°C, faz o trabalho de ligar cada nucleotídeo ao anterior (polimerização), na posição em que este se pareia com outro nucleotídeo contendo a base complementar, que se encontra na fita molde de DNA do fungo. Nem todas as enzimas polimerases permanecem intactas em temperaturas elevadas, por isso, esse processo só se tornou mais prático depois que se descobriu a *Taq* DNA polimerase, que foi isolada de uma bactéria termófila, que tem tolerância a temperaturas elevadas, denominada de *Thermus aquaticus*.

Depois, para verificar a posição em que a base nitrogenada se colocou na sequência complementar à do DNA do fungo, há duas maneiras bem conhecidas: ou se usa algum elemento radioativo na molécula da base nitrogenada a ser detectada ou liga-se a ela uma molécula denominada fluoróforo que após absorver energia, emite também certa energia, que pode ser detectada por um determinado aparelho.

O ciclo de reação para a replicação do DNA, tecnicamente denominado de ciclo de amplificação, é repetido por cerca de 40 vezes, em um pequeno aparelho denominado de termociclador, onde são encaixados os microtubos contendo inicialmente a solução composta de DNA do fungo, os iniciadores (*primers*), os nucleotídeos soltos, a enzima polimerase e substâncias tampão.

Resumidamente, cada ciclo de amplificação compreende: a) aquecimento entre 92°C-94°C, para que as fitas duplas de DNA se separem; b) um abaixamento rápido da temperatura por volta de 55°C, para que os *primers* pareiem com as sequências conservadas, e c) outro aumento de temperatura, por volta de 72°C, para que a enzima polimerase ligue os nucleotídeos complementares entre si e, assim, o novo trecho de fita, onde há o segmento espécie-específico, seja construído.

Uma bela animação de como esse processo acontece pode ser vista em: https://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=iQsu3Kz9NYo.

Concluída a primeira etapa de amplificação da sequência alvo, procede-se à confirmação de que esta foi realmente amplificada por meio de uma eletroforese em gel de agarose. Nessa eletroforese, os fragmentos de DNA inseridos no gel, submetidos a uma diferença de potencial, irão migrar do polo negativo para o polo positivo. Isso ocorre porque as moléculas de DNA possuem carga negativa. Os fragmentos menores migrarão com mais rapidez, avançando mais, e os maiores migrarão mais lentamente, avançando menos. Dessa forma, é possível separar os fragmentos de DNA de acordo os respectivos tamanhos, determinado pelo número de pares de bases.

No nosso caso, o segmento analisado apresenta cerca de 550-600 pares de bases. Esse fragmento pôde ser visualizado no gel de eletroforese, por meio do uso de uma substância denominada brometo de etídio, um corante, que pode ser adicionado ao gel ou misturado diretamente à suspensão de DNA. O brometo de etídeo é utilizado porque, além da afinidade e capacidade de penetrar por entre as fitas de DNA, razão de ser conhecido como agente intercalante, ele emite fluorescência ao ser atingido por raios ultravioleta.

As inúmeras cópias de uma determinada região do DNA, quando submetidas à eletroforese, migrarão na placa de gel de agarose de forma a se concentrar em um mesmo ponto (veja banda A na figura 8), isso porque ocorre uma migração conjunta de fragmentos de tamanhos semelhantes, fenômeno denominado de comigração.

Concomitantemente, na mesma placa de gel, se coloca e faz migrar amostras de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (figura 8 - C), de forma que, ao se deslocarem pela placa, os fragmentos estacionarão em pontos diferentes, de acordo com seus tamanhos,

formando bandas. Dessa forma, é possível estimar o tamanho dos fragmentos contidos em amostras investigadas, por meio da posição de suas bandas, comparadas com as posições das bandas da amostra padrão, semelhante ao que observa na figura anterior.

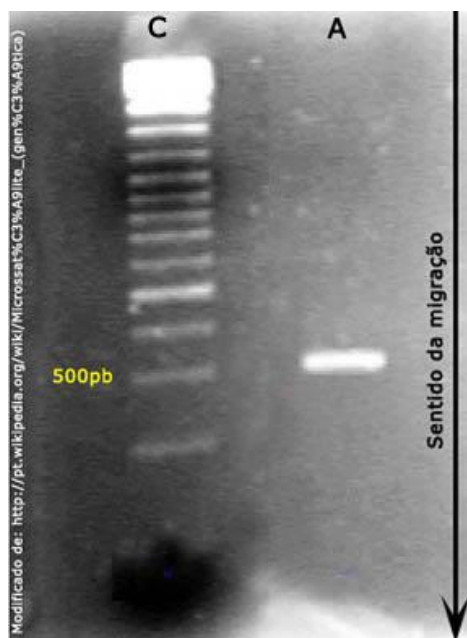


Figura 8 - Placa de gel após eletroforese: (C) Bandas de fragmentos de DNA com pesos moleculares conhecidos e (A) banda de amostra investigada.

O sequenciamento de bases, propriamente dito

Uma vez confirmado que o fragmento desejado de DNA foi amplificado, inicia-se outra etapa também importante que é a do sequenciamento, ou seja, a determinação da posição exata de cada nucleotídeo com relação ao seu anterior e ao seu subsequente.

Para que isso possa ser feito, há a necessidade de purificar o produto de amplificação que foi gerado, de forma a manter apenas o fragmento amplificado e eliminar os demais componentes, tais como *primers*, fitas de DNA de outras regiões, restos da enzima *Taq* Polimerase.

Após a purificação é preciso quantificar o DNA da amostra, porque quantidades abaixo de certos valores não permitem obter bons resultados no sequenciamento. Para isso, usam-se aparelhos específicos como o NanoDrop ou NanoVue, por exemplo, capazes de estimar concentrações de DNA em amostras de pequenos volumes, como de um microlitro (1 μ l), ou se faz uma nova eletroforese em gel, que permite estimar a quantidade de DNA da amostra por comparação com a de um marcador apropriado, *Low mass*, contendo mistura de

diferentes tamanhos de segmentos de DNA. A comparação é possível, porque o marcador, no gel da eletroforese, resultará em diversas bandas de diferentes tamanhos, de acordo com o número de pares de bases que ele tem e cujas concentrações são conhecidas e normalmente expressas em nanograma por microlitro (ng/μl).

Só depois da quantificação, o DNA do fungo de *C. glandulosus* foi encaminhado para o sequenciamento gênico propriamente dito.

Existem diferentes métodos para se realizar o sequenciamento, mas, neste caso, foi realizado o método denominado de dideoxi, que hoje também faz uso da PCR.

O método dideoxi foi desenvolvido originalmente por Frederick Sanger, bioquímico inglês, que recebeu o Prêmio Nobel de Química por duas vezes: o primeiro em 1958, o segundo em 1980. Esse método leva em consideração o fato de não poder haver continuação da construção de uma fita complementar de DNA, se em um determinado ponto for introduzido um nucleotídeo em cuja molécula do açúcar não houver o radical hidroxila (OH) no carbono 3', como se pode verificar na representação da figura 9.

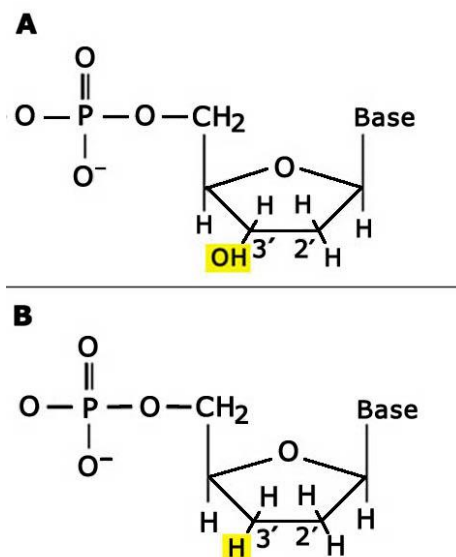


Figura 9 - Nucleotídeos: (A) Desoxinucleotídeo monofosfato, com hidroxila no carbono 3' do açúcar e (B) Dideoxinucleotídeo sem hidroxila no carbono 3'.

O nucleotídeo (B) da imagem anterior, conhecido como terminal, por interromper a polimerização do DNA a partir do ponto em que ele for introduzido, pode ter como bases a timina, a adenina, a guanina e a citosina. Essas bases podem receber marcação (molécula acoplada) denominada de fluoróforo e não mais elemento radioativo, processo utilizado originalmente por Sanger. Como cada base emite uma cor própria, quando incidida com raio

laser, é possível saber, quando dele fazemos uso, qual delas está em cada ponto em que a polimerização do DNA foi interrompida

Sabendo que o DNA é composto por uma fita dupla, complementares entre si, as reações de sequenciamento serão agora realizadas em duas reações de PCR. Cada fita de DNA, com seu respectivo fragmento a ser sequenciado, será introduzida em um dos dois tubos, onde se encontra o respectivo *primer*. Assim, em um dos tubos ocorrerá amplificação apenas da fita 1 ou fita *sense*, enquanto no outro tubo a fita 2, também denominada *antisense*. *Sense* e *antisense* são nomes relativos aos sentidos de construção dos novos trechos dos fragmentos, a partir de seus complementares. (Veja figuras 6 e 7).

Por esta metodologia de sequenciamento, denominada de Sanger/dideoxi, para cada fita de DNA sequenciada, forma-se uma mistura de fragmentos de DNA complementares de diferentes tamanhos, porque sempre que entrar um nucleotídeo na forma dideoxi, a reação da polimerase parará naquele ponto, que ficará marcado por causa do fluoróforo acoplado ao nucleotídeo terminal.

Imagine uma sequência de nucleotídeos com as bases representadas a seguir, em um dos tubos, e o nucleotídeo terminal com a base timina (T*) durante a construção do segmento. Toda vez que ao invés de entrar um nucleotídeo com a base timina normal (T), entrar um com a base timina terminal (T*), a polimerização será interrompida.

Veja, na representação a seguir, um trecho de DNA, que, ao ser sequenciado, gerou fragmentos complementares de diversos tamanhos (5 trechos na metade inferior do quadro), porque durante o pareamento das bases complementares, ao invés de entrar uma timina normal (T), entrava uma timina terminal (T*), que interrompia o processo naquele ponto.

Representação de um trecho de DNA a ser sequenciado, em um meio contendo nucleotídeos com a base timina dideoxi (T*), portanto, terminal
TAATGCAAATTCCTTGGGTAGGCCCCATT - (trecho de DNA a ser sequenciado)
Fragmentos complementares, replicados durante a "PCR"
ATTACGTTTAAGGAA CCCATCCGGGGTAA {nenhum nucleotídeo com timina dideoxi entrou no pareamento}
ATTACGTT*
ATTACGTTTAAGGAA CCCAT*
ATT*
ATTACGTTTAAGGAA CCCATCCGGGGT*

O mesmo que foi demonstrado para o que acontece em presença de uma base timina marcada (T*), também acontecerá com as outras bases marcadas, que são adicionadas ao

meio, adenina (A*), citosina (C*) e guanina (G*). Quando cada uma delas entrar na sequência para parear com sua respectiva base complementar, a cadeia será interrompida naquele ponto.

Uma mistura como essa, contendo fragmentos complementares de diferentes tamanhos tendo as bases terminais T*, A*, C*, G* será, então, submetida a um aparelho de sequenciamento, que consegue separar os fragmentos de acordo com os seus tamanhos, inclusive quando houver diferença de até um único nucleotídeo, por meio de um sistema de eletroforese capilar. A leitura da sequência de nucleotídeos, em bandas, será então obtida fazendo-se incidir um feixe de laser no capilar, o que diferenciará as cores dos 4 nucleotídeos marcados com fluoróforo. A sequência de ambas as fitas de DNA (*sense* e *antisense*) são obtidas, e como uma é complementar à outra, obtém-se a fita dupla dessa região sequenciada.

No sequenciamento realizado para identificação do *Euoidium* sp. que infestou o *Croton glandulosus*, um fragmento do cromatograma de uma das fitas geradas (M22) pode ser observado na figura 10.

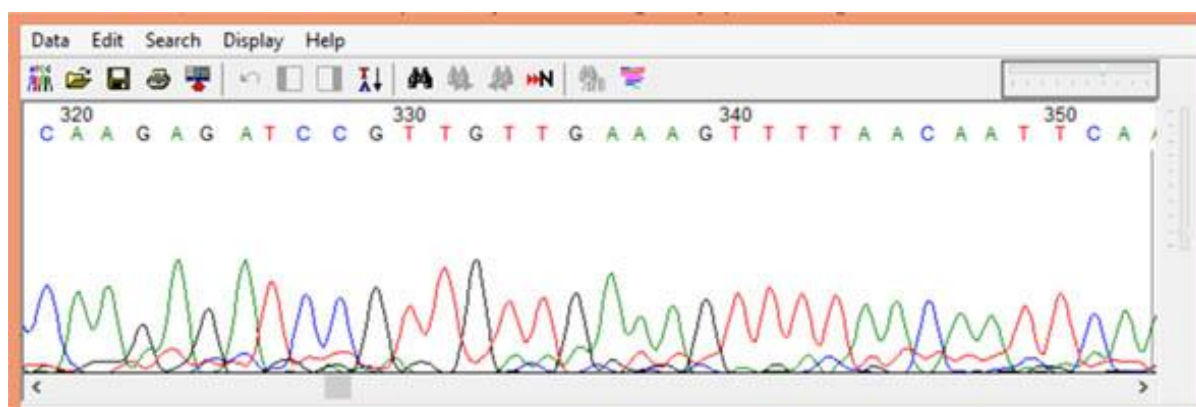


Figura 10 - Cromatograma de uma das fitas de DNA (M22) do *Euoidium* sp. que infestou *Croton glandulosus*.

Identificação do fungo causador de oídio em *Croton glandulosus*

A última etapa desse processo, que possibilita a identificação molecular, é a comparação da sequência obtida com todas as sequências gênicas existentes nos bancos de dados genômicos disponíveis na internet (*Genbank* e outros). Isso é feito utilizando-se de ferramentas de bioinformática apropriadas, como MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Realizando todo esse procedimento, foi possível obter uma sequência exata de 552 nucleotídeos do trecho de DNA específico do fungo parasítico *Euoidium* sp de *Croton glandulosus*, sequência essa grande e, portanto, confiável, conforme o que foi explicado no item “Modelo adequado, explicações simples”. Quando essa sequência foi comparada àquelas

existentes no banco de dados *Genbank*, verificou-se que o fungo causador do oidium em *C. glandulosus* pertence ao gênero *Golovinomyces*, do Filo Ascomycota, Ordem Erysiphales (Figura 11). Trata-se de um gênero que, sabidamente, contém espécies de fungos causadores de doenças em plantas, normalmente denominadas de oidio ou oidium, mas que ainda não havia sido detectado em *Croton glandulosus*.

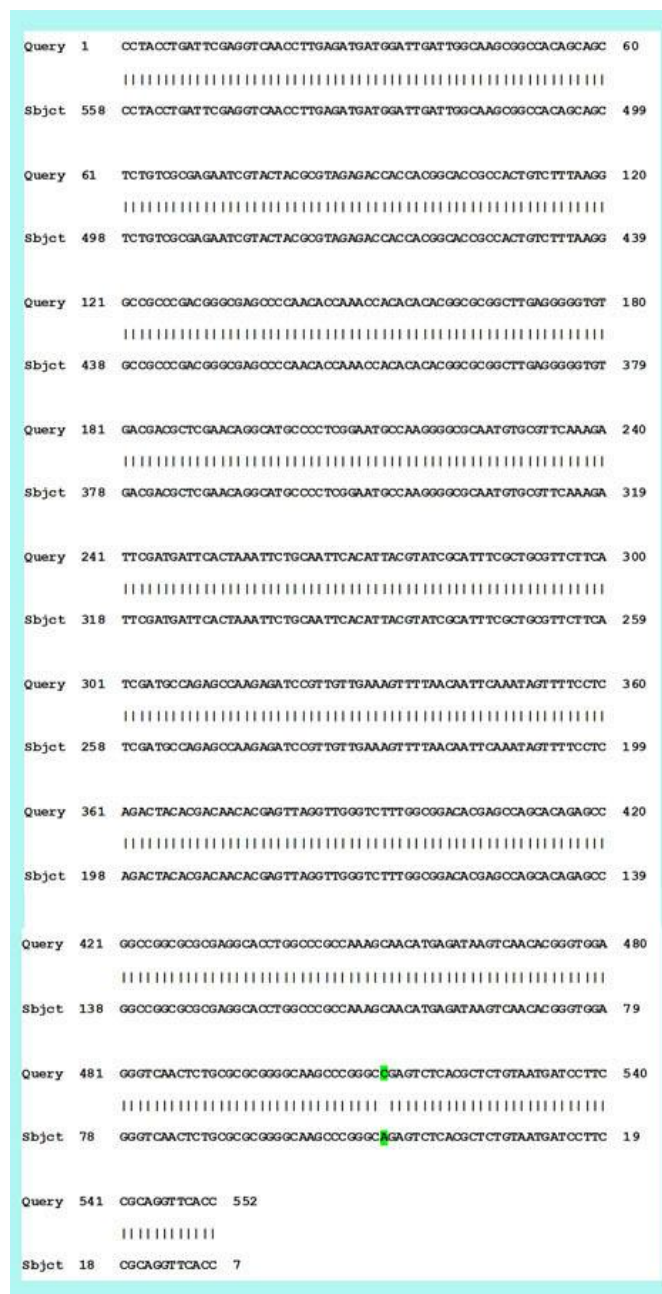


Figura 11 - Resultado da comparação (pelo BLASTn (NCBI) entre a sequência *Query* (investigada), que representa o fragmento com 552 pares de bases do fungo de *Croton glandulosus* obtido no Laboratório de Biologia de Fungos do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, e a sequência *Sbjct* (base para comparação), que representa o fragmento de bases do depósito Genbank AB769427.1, pertencente ao fungo *Golovinomyces* sp.

Com esse resultado, resta ainda uma pergunta: Por que não foi possível identificar exatamente a espécie do fungo que infesta *C. glandulosus*, mas, sim, saber apenas que ela é uma das espécies que pertencem ao gênero *Golovinomyces*?

Uma resposta plausível a essa pergunta seria dizer que o banco de dados consultado, o *Genbank*, seria como uma biblioteca desfalcada de certos exemplares de livros, que nos permitiriam conhecer melhor o assunto que procuramos. E, é claro, pode haver diferentes razões para esse desfalque, como, por exemplo: falta de recurso para conseguir um exemplar que contivesse os detalhes desejados do assunto; inexistência desses detalhes, simplesmente porque ainda não teriam sido estudados etc. Portanto, quando uma sequência molecular de bases, em trechos de DNA de fungos é estudada por micologistas experientes, são também consideradas as características morfológicas da fase sexuada, e vários outros dados biogeográficos, de ecologia e evolução dos respectivos fungos. Dessa forma, associando-se dados dessa natureza, assegura-se que um determinado fungo tem, de fato, a identificação específica que lhe é atribuída. Digamos então, que um micologista tenha conseguido associar certa sequência de bases, a certo fungo, identificado anteriormente por meio da sua estrutura reprodutiva, identificação esta que teria permitido saber apenas a que gênero ele pertence. Nesse caso, não teríamos como saber de que espécie se trata. A dificuldade do micologista, que teria usado as estruturas reprodutivas, para identificar aquele fungo, poderia estar relacionada, por exemplo, ao fato de se tratar de uma espécie nova, uma espécie que ainda não teria sido descrita. Nesse caso, aquela sequência de bases associada ao fungo, só poderia permitir saber a sua espécie, quando o fungo fosse descrito e recebesse um nome específico. Neste caso, quando alguém posteriormente comparasse uma sequência de bases que obteve a partir de um trecho de DNA de oídio, como nós fizemos, com tudo o que foi depositado no banco de dados, e encontrasse uma amostra muito semelhante à que possui e que pertence a esse fungo descrito, a chance de ter chegado a uma identificação confiável é grande. Se, ao contrário, encontrasse uma sequência de bases não muito semelhante à sequência do DNA que está estudando, a identificação do fungo poderia não chegar sequer ao nível de gênero, mas, certamente, já indicaria ou o filo ou a ordem ou, até mesmo, a família a que ele pertence.

Agora que já sabemos que o fungo de *C. glandulosus* pertence ao gênero *Golovinomyces*, mas de espécie desconhecida, por isso é referido como *Golovinomyces* sp., poderemos enriquecer o *Genbank* com mais este dado. Assim, qualquer pessoa no mundo todo, interessada em saber, por exemplo, quais as diferentes espécies de plantas que são atacadas por fungos pertencentes ao gênero *Golovinomyces*, saberá que uma delas é *Croton glandulosus*.

Mas, se é possível a qualquer pessoa introduzir dados no *Genbank*, como ter segurança de que ninguém introduzirá informação errada por lá? Afinal, tal atitude levaria a erros, prejudicando futuras comparações, conseqüentemente prejudicando pesquisas científicas.

Essa questão é muito, muito importante. E foi prevendo a possibilidade de erros na introdução das informações, que cientistas especialistas nessas identificações responsabilizaram-se por checar, com muito rigor, todos os dados novos que chegam. Dessa forma, eles garantem a veracidade e qualidade de tudo que é introduzido no *Genbank*.

Finalizando, ressaltamos a importância da integração de diferentes áreas do conhecimento, como evidenciado neste artigo, tanto para que avanços científico-tecnológicos sejam alcançados contemplando a complexidade dos sistemas estudados, como para que os resultados das pesquisas passem por transposições didáticas adequadas e alcancem alunos, principalmente do Ensino Fundamental e Médio, que precisam ser estimulados a se interessar por Ciência e ser capaz de compreender as inúmeras e importantes questões atuais.

Referências

- ANUÁRIO BRASILEIRO DA EDUCAÇÃO BÁSICA. São Paulo: Editora Moderna, 2013. Disponível em:
<<http://www.moderna.com.br/lumis/portal/file/fileDownload.jsp?fileId=8A8A8A833F33698B013F346E30DA7B17>>. Acesso em: 20 mai. 2015.
- BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A. Micologia médica molecular: Impacto na epidemiologia e ecologia dos fungos In: ZAITZ, C. et al. (Org.). **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. v. 2, p. 123-137.
- BRASIL. Ministério da Educação. **Relatório Nacional Pisa 2012**: resultados brasileiros. São Paulo: Fundação Santilana, 2012. Disponível em:
<http://download.inep.gov.br/acoes_internacionais/pisa/resultados/2014/relatorio_nacional_pisa_2012_resultados_brasileiros.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2015.
- MACHADO, S. (Coord.). **Papel das estruturas glandulares de *Croton glandulosus* L. (Euphorbiaceae) na interação tritrófica**: planta, predadores de sementes pré-dispersão e respectivos parasitóides - uma proposta de estudo interdisciplinar, produção de material didático e divulgação científica. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2008. (Projeto de Auxílio Regular à Pesquisa, FAPESP).
- MASON, S. F. **História da Ciência**: As principais correntes do pensamento científico. Porto Alegre : Globo, 1964.
- NICOLESCU, B. **O manifesto da transdisciplinaridade**. São Paulo : TROM, 1999.
- RONAN, C. A. **Da Renascença à Revolução Científica**. Rio de Janeiro : Jorge Zahar Editor, 1987. (coleção, História Ilustrada da Ciência, v. 3).
- SAGAN, C. **O mundo assombrado pelos demônios**. São Paulo: Companhia das Letras, 2006.

WATSON, J. D. e CRICK, F. H. C. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 964-967, 1953.

**FROM PATERNITY TESTING TO THE ART OF FUNGAL IDENTIFICATION:
BRINGING SCIENTIFIC KNOWLEDGE INTO THE CLASSROOM AND PUBLIC
DIVULGATION**

Abstract.

In order to empower high school students and undergraduates in Biological Sciences to acquire basic concepts of molecular biology for the understanding of issues related to taxonomy, evolution and criminal investigation, we present unpublished results of an interdisciplinary research aimed study to identify a phytopathogenic fungus by means of a narrative that historically contextualizes the theoretical constructs that enabled these advances.

Keywords. Biology education; phytopathogenic fungus; molecular biology; Polymerase Chain Reaction; *Golovinomyces* sp.

Agradecimentos: Às professoras Dr^a Elza M. Guimarães Santos e Dr^a Adriane Wasko, pela cuidadosa leitura e sugestões apresentadas.