



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E**  
**BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**MONTAGEM, ANOTAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DO GENOMA DE**  
***Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720**

**SUELEN DIAS DA SILVA**

Manaus – AM

2021

**SUELEN DIAS DA SILVA**

**MONTAGEM, ANOTAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DO GENOMA DE  
*Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Adolfo José da Mota

Coorientador: Dr. José Odair Pereira

Manaus – AM

Março 2021

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586m Silva, Suelen Dias da  
Montagem, anotação e análise estrutural do genoma de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 / Suelen Dias da Silva. 2021  
119 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adolfo José da Mota  
Coorientador: José Odair Pereira  
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Basidiomiceto. 2. Genoma. 3. Compostos bioativos. 4. Fermentação submersa. I. Mota, Adolfo José da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

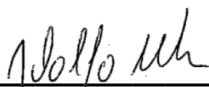
**Suelen Dias da Silva**

**MONTAGEM, ANOTAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DO GENOMA DE  
*Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

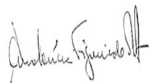
Orientador (a): **Prof. Dr. Adolfo José da Mota**

**Banca Examinadora:**



---

**Dr. Adolfo José da Mota (UFAM)**  
Presidente da banca



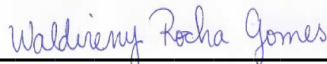
---

**Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE)**  
Membro



---

**Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva (UFAM)**  
Membro



---

**Dra. Waldireny Rocha Gomes (UFAM)**  
Membro



---

**Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes (FIOCRUZ/AM)**  
Membro

Manaus – AM

Março 2021

## DEDICATÓRIA

A todos que tudo fizeram  
para que eu me tornasse quem sou e  
para que chegasse onde estou: Deus,  
meus pais (*in memoriam*) e família.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ser o centro da minha vida, meu porto seguro, onde eu posso encontrar refúgio. Aos meus pais (*in memoriam*), pelo apoio, amor incondicional expresso em incentivo, dedicação e carinho.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, por serem tão presente na minha vida. Obrigada, por todo amor e por se doarem tanto por mim. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Adolfo José da Mota, pela confiança, paciência e apoio sempre. Pelo exemplo de profissionalismo, ética, sabedoria e retidão pessoal, bem como pela presença amiga, e acima de tudo por desempenhar com precisão o papel de orientador. Muito obrigada, por esse tempo de muito aprendizado!

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Odair Pereira pelo exemplo profissional, humildade e pelas palavras sábias.

A Andressa e Jaci, amigas que se tornaram irmãs. Obrigada pelo apoio, pelos momentos de choro, riso, pela motivação, torcida e por sempre estarem presente em todos os momentos!

A minha amiga/irmã Eliane, por toda ajuda sempre, pelas risadas, reciprocidade, respeito, carinho, confiança, por dividir conhecimento e se fazer tão presente.

A minha amiga Alessandra, pelo companheirismo, pela convivência no laboratório, pelos cuidados diários, pelo carinho e apoio.

As minhas amigas do laboratório para a vida: Alessandra, Lucivana, Marjory, Claudia, Sabrina e Lorena. Obrigada por todos os momentos de alegria, de terapia em grupo, pelo incentivo, pelas loucuras, pelo apoio, pelas conversas boas, que preenchem o tempo, cabeça e coração.

As minhas amigas Anita e Pamella, por todas as palavras de incentivo e apoio. Obrigada por estarem serem dispostas a discussões científicas e conversas à toa sobre a vida.

Ao Prof. Dr. Waldeyr Mendes Cordeiro da Silva do NEPBIO, Instituto Federal de Goiás, Formosa/Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília por toda colaboração com a parte da bioinformática e pela disponibilidade em ajudar. Muito obrigada, pela parceria!

A Profa. Dra. Francisca Simas da Coleção de Culturas DPUA/Instituto de Ciências Biológicas da UFAM, por me receber com tanto carinho e se dedicar a ensinar com paciência. A Elliza, Lainah, Ana, Larissa, Dib, Fabiano, Salomão, Samara, Taciana, Prof Felipe, Profa. Waldireny e Profa. Socorro por toda colaboração, apoio científico e amizade.

A Samara por todo apoio e colaboração. Muito obrigada!

A todos os colegas do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas.

Aos professores que participaram da Banca de Qualificação, Profa. Dra. Ormezinda Celeste Fernandes, Prof. Dr. Carlos Gustavo da Silva e Dra. Taciana de Amorim Silva, pelas sugestões e correções.

Ao Programa Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal-BIONORTE e a todos os professores do programa.

Ao Coordenador da BIONORTE do colegiado estadual do Amazonas, Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen pela compreensão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que permitiu a execução dessa pesquisa.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta, ajudaram na realização da presente pesquisa.

## RESUMO

Os cogumelos são usados desde os tempos remotos devido seu valor terapêutico. Muitas espécies são fontes de compostos bioativos que podem apresentar efeitos benéficos à saúde, como potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, antimutagênico, anticâncer, neuroprotetivo, hepatoprotetivo entre outros. Este trabalho tem como objetivo fazer a autenticação molecular do cogumelo, sequenciar, anotar e analisar o genoma de *Pleurotus ostreatoroseus*, analisar a sua composição nutricional, sua atividade antioxidante e antimicrobiana. A autenticação molecular foi realizada pela amplificação dos genes rRNA nucleares de fungos, e depositada no NCBI. O sequenciamento foi realizado no Illumina HiSeq e montado pelo método *de novo* com software SOAP. O tamanho total do genoma de *P. ostreatoroseus* é de 43.81Mb, com conteúdo GC de 56.04%, e 9,263 genes. A montagem gerou 38.588,771 contigs, com N50 de 180,9. Foram realizadas anotações no Gene Ontology (GO), KEGG, KOG, NR, TCDB e CAZy. Pelo KEGG foi possível observar a rede do metabolismo da espécie, apresentando genes envolvidos majoritariamente em catabolismo/transporte (274 genes) e metabolismo de carboidratos (248 genes). Na anotação do GO os genes mais abundantes envolvidos nas três categorias de anotação foram: (1) Componente Celular, 2.137 genes envolvidos em junções celulares; (2) Função Molecular, 3.265 genes associados à atividade de ligantes não definidas (3) Processo Biológico, 3.171 genes ligados a processos multi-organismo. Na anotação KOG, a maioria dos genes (221) foi associada a modificações pós-traducionais e chaperonas. Na anotação NR foi realizada a comparação proteica com vinte espécies fúngicas depositadas nos bancos de dados NCBI, e observou-se a similaridade de 3.194 genes de *P. ostreatoroseus* com a espécie fúngica *Phanerochaete carnosae*. Os agrupamentos de genes de metabólitos secundários revelaram um total de 27 *clusters*, incluindo 10 terpenos, 1 t3pkse, 5 t1pks e outros 11 *clusters*. A composição centesimal da biomassa micelial revelou teor de proteínas 12,81%, carboidratos 33,64%, fibras 3,78% e lipídios 1,43%. Análise da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos de *P. ostreatoroseus* não tiveram ação antifúngica e antibacteriana. A partir do extrato etanólico, foram determinados a composição total de fenóis (19,6 mg EAG/g) e a atividade antioxidante pelos ensaios de ABTS (84,1  $\mu\text{mol TE/g}$ ), DPPH (324,8  $\mu\text{mol TE/g}$ ) e FRAP (472,6  $\mu\text{M TE/g}$ ). Os resultados reportados nesse trabalho irão auxiliar pesquisas futuras com



aplicações biotecnológicas, pois o dado genético fornece informações importantes sobre a biologia do cogumelo.

Palavras-chave: Basidiomiceto; genoma; compostos bioativos; fermentação submersa.

## ABSTRACT

Since remote times, Mushrooms have been used due to their therapeutic value. Several species are sources of bioactive and they can provide beneficial health effects, such as antioxidants potential, antimicrobial, anti-inflammatory, antimutagenic, anticancer, neuroprotective, hepatoprotective, among other things. This research aims to do the mushroom molecular authentication, sequence, annotate and analyse of *Pleurotus ostreatoroseus* genome, analysing its nutritional composition, and its antioxidant and antimicrobial activity. The molecular authentication was performed by amplification of the fungi nuclear rRNA genes, and deposited in the NCBI. The sequencing was performed at Illumina HiSeq and assembled by the method *de novo* with SOAP software. The total size of the *P. ostreatoroseus* genome is 43.81Mb, with a GC content of 56.04%, and 9,263 genes. The assembly generated 38,588,771 contigs, with an N50 of 180.9. Annotations were made in Gene Ontology (GO), KEGG, KOG, NR, TCDB and CAZy. Through KEGG was possible to observe the metabolism network of the species, presenting genes mainly involved in catabolism/transport (274 genes) and carbohydrate metabolism (248 genes). In the GO annotation, the most abundant genes involved in the three annotation categories were: (1) Cell Component, 2,137 genes involved in cell junctions; (2) Molecular function, 3,265 genes associated with the activity of undefined ligands (3) Biological process, 3,171 genes linked to multi-organism processes. In the KOG annotation, most genes (221) were associated with post-translational modifications and chaperones. In the NR annotation, a protein comparison was made with twenty fungal species deposited in the NCBI databases, and the similarity of 3,194 *P. ostreatoroseus* genes with the fungal species *Phanerochaete carnososa* was observed. The clusters of secondary metabolite genes revealed a total of 27 clusters, including 10 terpenes, 1 t3pkse, 5 t1pks and another 11 clusters. The proximate composition of the mycelial biomass revealed a protein content of 12.81%, carbohydrates 33.64%, fibers 3.78% and lipids 1.43%. Analysis of the antimicrobial activity of extracts obtained from *P. ostreatoroseus* had no antifungal and antibacterial action. From the ethanolic extract, the total composition of phenols (19.6 mg EAG / g) and antioxidant activity were determined by the ABTS (84.1  $\mu\text{mol TE / g}$ ), DPPH (324.8  $\mu\text{mol TE / g}$ ) assays and FRAP (472.6  $\mu\text{M TE / g}$ ). The results reported in this research will assist future research with biotechnological

applications, as the genetic data provides important information about the biology of the mushroom.

Key words: Basidiomycete; genome; bioactive compounds; submerged fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> .....	21
Figura 2 Delineamento experimental.....	32
Figura 3: Representação física dos amplicons correspondentes as regiões 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e D1/D2 do gene 28S com seus respectivos oligonucleotídeos. ....	35
Figura 4: Perfil eletroforético do DNA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. M: Marcador Lambda 10 ng/μL. 1-2: amostras de DNA extraído. ....	43
Figura 5: Amplificação do rDNA em gel de agarose 1%. M: Marcador de peso molecular 1kb Plus; 1-3: Produto da PCR amplificados usando os iniciadores 611/572 (1), 571/572 (2), 350/351(3). ....	44
Figura 6: Gel de agarose 1% de produtos da PCR purificados. 1-2: Amostras purificadas. ....	44
Figura 7: Resultados estatísticos da anotação de genes.....	54
Figura 8: Anotação da função GO de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	55
Figura 9: Anotação funcional KEGG de <i>P. ostreatoroseus</i> . ....	59
Figura 10: Anotação KOG de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	63
Figura 11: Estatística das espécies e genes anotados. ....	65
Figura 12: TCDB classificação das proteínas de transporte em <i>P. ostreatoroseus</i> . ....	66
Figura 13: Classificação fenotípica PHI em <i>P. ostreatoroseus</i> . ....	67
Figura 14: Gráfico de colunas indicando a distribuição dos domínios CAZy. CBM: módulo de ligação a carboidratos; CE: esterase de carboidratos; GH: glicosídeo hidrolase; GT: glicosiltransferase; AA: atividade auxiliar e PL: polissacarídeo. ....	68
Figura 15: Horizontal representa o nome do agrupamento de genes e a vertical mostra o número de agrupamentos de genes. As barras azuis correspondem ao número do gene em cada agrupamento, enquanto as barras vermelhas representam o número de agrupamentos. ....	75

Figura 16: Ausência de halos de inibição contra: *E. coli* (A- extrato micélio e B- extrato basioma), *S. aureus*: (C- extrato micélio e D- extrato basioma) e *C. albicans* (E- extrato micélio e F- extrato basioma)..... 78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos iniciadores .....	35
Tabela 2: Identificação taxonômica de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> baseada em máxima identidade a partir do alinhamento de sequências de nucleotídeos.....	45
Tabela 3: Estatísticas do genoma de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> .....	47
Tabela 4: Estatística dos genes preditos.....	48
Tabela 5: Estatística de ncRNA no genoma de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	50
Tabela 6: Anotação do total de TEs de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	52
Tabela 7: Estatística das repetições em <i>tandem</i> .....	53
Tabela 8: Genes putativos envolvidos na biossíntese do esqueleto terpenóide.....	76
Tabela 9: Atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	84
Tabela 10: Caracterização centesimal da massa micelial liofilizada de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$  – Micrograma  
 $\mu\text{M}$  – Micromolar  
bp – pares de bases  
AA – Atividades auxiliares  
ABTS<sup>+</sup> – 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiazolona-6-sulfonato)  
AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism  
AOAC – Associação Oficial Químicos Analíticos  
BDA – Ágar Dextrose Batata  
BLAST – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local  
CAZy – Carbohydrate-Active enZymes  
CBM – Módulos de ligação a carboidratos  
CE – Esterases de carboidratos  
CFT – Compostos Fenólicos Totais  
CIM – Concentração Mínima Inibitória  
COG – Clusters of orthologous groups of proteins  
ddNTP – Dideoxynucleotídeos trifosfatados  
DMAPP – carbono dimetilalil difosfato  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
DPPH – 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil  
DPUA – Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas  
DFVF – Banco de dados de fatores de virulência fúngica  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
ESR – Electron Spin Resonance  
FRAP – Capacidade redutora de ferro total  
Fe – Ferro  
g – Grama  
GH – Hidrolase glicosídica  
GO – Gene Ontology  
GT – glicosiltransferaseFho  
GYP – Glicose extrato de levedura peptona  
IPP – difosfato de isopentenil  
ITS – Região espaçadora transcrita interna  
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
Kg – Quilograma  
LSS – lanosterol sintase  
M – Marcador de peso molecular  
mg – Miligrama

Mg – Magnésio  
mL – Mililitro  
mM – Milimolar  
MVA – via do mevalonato  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
ng – Nanograma  
NGS – Next Generation Sequencing  
NR – Proteínas não redundantes  
ncRNAs – RNAs não codificantes  
°C – Grau Celsius  
ORAC – Capacidade de absorção de radical oxigênio  
PCR – Reação em cadeia de polimerase  
PG – Pós-Graduação  
PDB – Protein Data Bank  
PIR – Protein Information Resource  
PHI – Interação patógeno-hospedeiro  
PL – Polissacarídeo liase  
PRF – Protein Research Foundation  
RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA  
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism  
SSR – Single Seed Descendent  
rRNA – RNA ribossômico  
tRNA – RNA transportador  
miRNA – microRNA  
snRNA – small nuclear RNA  
ncRNA – RNA não codificante  
SBS – Sequenciamento por síntese  
Swiss-Prot  
SSR – repetições de sequência simples  
MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio  
T1pks – Policetídeo sintases iterativas tipo I  
T3pks – Policetídeo sintases iterativas tipo III  
Ta – Temperatura de anelamento  
Taq – *Thermus aquaticus*  
TCDB – Transporter Classification Database  
TE – Tris EDTA  
TE – elementos transponíveis  
TEAC – Capacidade antioxidante equivalente em Trolox  
TR – Repetição em tandem  
TRAP – Potencial antioxidante reativo total  
U – Unidade enzimática



UFAM – Universidade Federal do Amazonas  
YES – Extrato de Levedura Sacarose

# SUMÁRIO

## 1 INTRODUÇÃO15

1.1 Objetivos17

1.1.1 Objetivo geral17

1.1.2 Objetivos específicos:17

## 2 REVISÃO DA LITERATURA18

2.1 Cogumelos18

2.2 Bioatividades dos cogumelos19

2.2.1 Antimicrobianos20

2.2.2 Antioxidante21

2.3 Gênero *Pleurotus*23

2.4 *Pleurotus ostreatoroseus*24

2.5 Identificação molecular27

2.6 Sequenciamento do genoma de fungos28

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS32

3.1 Reativação da linhagem *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 172032

3.2 Identificação molecular33

3.2.1 Extração do DNA33

3.2.2 Pureza, quantificação e integridade do DNA34

3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)34

3.2.4 Reação de sequenciamento35

3.2.5 Purificação da reação de sequenciamento36

3.2.6 Processamento das sequências36

3.3 Sequenciamento, montagem e anotação do genoma36

3.4 Seleção qualitativa de compostos bioativos38

3.4.1 Cultivo submerso para produção de massa micelial38

3.4.2 Processamento dos basidiomas38

3.4.3 Extração dos compostos39

3.5 Método difusão em ágar por poço ou *cup-plate*39

3.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)39

3.7 Atividade antioxidante40

3.7.1 Capacidade sequestrante dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>40

3.7.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)41

3.7.3 Capacidade Redutora de Ferro Total (FRAP)41

3.8 Determinação da composição centesimal da biomassa41

3.9 Análise Estatística42

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO43**

4.1 Identificação Molecular43

4.2 Sequenciamento e anotação do genoma46

4.2.1 Sequenciamento e Montagem *de novo*46

4.2.2 Predição de Componentes do Genoma48

4.2.3 Predição Funcional Genômica53

4.2.3.1 Gene Ontology (GO)54

4.2.3.2 KEGG58

4.2.3.3 KOG62

4.2.3.4 NR64

4.2.3.5 TCDB65

4.2.3.6 PHI66

4.2.3.7 CAZy (Carboidrate Active enzymes)67

4.2.3.8 Metabolismo secundário74

4.3 Atividade antimicrobiana77

4.3.1 Método de difusão em ágar77

4.3.2 Teste da Concentração Mínima Inibitória79

4.4 Atividade antioxidante82

4.4.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT) e poder antioxidante.82

4.5 Composição centesimal84

## **5 CONCLUSÃO90**

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS91**

## **7 APÊNDICE115**

## 1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis são macrofungos com um corpo frutífero distinto, extensamente cultivados ao redor do mundo desde a antiguidade. São conhecidos por suas propriedades medicinais e nutricionais, além do grande potencial econômico, revelado pelos avanços da biotecnologia (BRUGNARI et al., 2016, RATHORE et al., 2019).

Os cogumelos comestíveis detêm as três propriedades intrínsecas aos alimentos, como nutrição, sabor e funções fisiológicas. Devido as suas propriedades nutricionais, os cogumelos possuem altos teores de proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerais, fibras, e baixos teores de lipídios, calorias, sódio e colesterol; seu sabor, aroma e textura específicos, apresentam substâncias aromatizantes de alimentos por possuírem compostos voláteis e também compostos que realçam o sabor, incluído aminoácidos e açúcares; e funções fisiológicas, pela presença de substâncias bioativas, como os polissacarídeos, peptídeo-glucanas, terpenos, esteróis e compostos fenólicos, que auxiliam no funcionamento fisiológico do organismo humano e podem oferecer muitos benefícios à saúde. (WANG et al., 2017; YAHIA et al., 2017; PAZZA et al., 2019; ALZAND et al., 2019).

Por serem importantes fontes de compostos bioativos e metabólitos, existem mais de 100 funções medicinais atribuídas aos cogumelos, e os principais usos medicinais são: antitumoral, imunomoduladora, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, anti-hipercolesterolemia, antimicrobiana, antiviral, antidiabética. Como resultado, extratos de cogumelos são usados para reduzir o risco de doenças cardíacas, assim como na prevenção no tratamento de Parkinson, Alzheimer, hipertensão, acidentes vasculares cerebrais e câncer (VALVERDE, 2015; HUANG et al., 2017).

Espécies de *Pleurotus* são encontradas em todo o mundo e estão entre as mais amplamente cultivadas. É bem conhecido que as espécies pertencentes a este gênero possuem diversas propriedades biotecnológicas e terapêuticas, além de alto valor nutricional. O cogumelo *Pleurotus ostreatoroseus* Singer é uma espécie autóctone de áreas tropicais e subtropicais com alta capacidade de degradar uma grande variedade de resíduos agroindustriais lignocelulósicos (PUTZKE, 2002; MIKIASHVILI, 2006). Este cogumelo é uma fonte potencial de compostos bioativos, incluindo ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, polissacarídeos e tocoferóis (CARBONERO et al., 2006; CORREA et al., 2015; BRUGNARI

et al., 2018). Ainda que haja comprovação dessas propriedades significativas e úteis, as informações da constituição genética desse cogumelo são escassas.

As técnicas moleculares vêm contribuindo para elucidar os mecanismos bioquímicos e moleculares dos cogumelos, e uma das metodologias largamente utilizadas atualmente é a análise do genoma dos organismos. A disponibilidade de sequências genômicas de fungos tem aumentado, facilitando a pesquisa da diversidade genética e a identificação de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários (MORIN et al., 2012; KOHLER et al., 2015; NAGY et al., 2016).

A genômica é, em grande parte, impulsionada pelo desejo de compreender a organização e função do genoma de diversos fungos. Ao longo dos últimos anos, com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), aumentaram o número de genomas sequenciados de todas as classes de seres vivos (CRISTANCHO et al., 2014; KERSEY et al., 2014).

Assim, no presente trabalho, o genoma de *Pleurotus ostreatoroseus* foi sequenciado. Também foi avaliado o potencial biotecnológico desse cogumelo, quanto a sua atividade antimicrobiana e antioxidante. As anotações funcionais foram realizadas utilizando os *softwares* (COG, GO, KEGG, CAZy, NR, Pfam, Swiss-Prot e TCDB), os quais forneceram informações sobre o metabolismo secundário e o metabolismo de carboidratos. Os resultados obtidos, além de gerar novos conhecimentos sobre a arquitetura genômica de *P. ostreatoroseus*, ampliarão as possibilidades de pesquisa para a espécie. Este pode ser considerado um trabalho pioneiro de estudos genômicos para cogumelos da Amazônia e os resultados obtidos abrem caminho para novas investigações.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Sequenciar o genoma de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, bem como também avaliar seu potencial biotecnológico quanto a sua atividade antimicrobiana e antioxidante.

### 1.1.2 Objetivos específicos:

-Identificar pela análise da sequência genética de espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA ribossômico de *P. ostreatoroseus*;

-Sequenciar e anotar o genoma de *P. ostreatoroseus*;

-Depositar o genoma de *P. ostreatoroseus* no banco de dados GenBank;

- Prospectar moléculas bioativas com os dados do genoma;

-Analisar o potencial antimicrobiano de *P. ostreatoroseus* frente a microorganismos patogênicos;

-Avaliar o potencial antioxidante de *P. ostreatoroseus*;

-Determinar a composição nutricional (composição centesimal e de minerais e valor calórico) da massa micelial de *P. ostreatoroseus*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Cogumelos

Os fungos macromicetos, popularmente conhecidos como cogumelos, pertencem principalmente ao filo Basidiomycota (basidiomicetos) e alguns deles ao filo Ascomycota (ascomicetos). A principal característica dos basidiomicetos é a presença de um basídio, estrutura protuberante onde são produzidos os esporos sexuais (GEHRING et al., 1998). A estrutura denominada de cogumelo é na verdade o corpo de frutificação do fungo, embora sejam de muitas variações na forma, tamanho e coloração, estas se mantêm razoavelmente constante nos diferentes grupos de fungos (MORADALI et al., 2007; MAITY et al., 2014).

Os cogumelos são conhecidos por possuírem extensos complexos de enzimas que os permitem florescer com sucesso em substratos lignocelulósicos contendo lignina, celuloses, hemiceluloses e pectina (ANDLAR et al., 2018).

Estima-se que existam pelo menos 12.000 espécies de cogumelos no mundo, dos quais apenas 10% são conhecidas. Destas, aproximadamente 2000 são espécies comestíveis e dentre estas, 35 são cultivadas comercialmente (SHARMA & GAUTAM, 2015; RATHORE et al., 2017). A China é a maior produtor mundial e o maior consumidor de cogumelos no planeta (MARTÍNEZ-IBARRA, 2019). No Brasil, o consumo ainda é muito inferior ao país oriental e os números pouco precisos, mas apresenta crescente evolução devido às melhorias na produção e anseio da população por uma alimentação mais saudável (KUMANAYA et al., 2018). As principais espécies de cogumelos cultivados no Brasil são *Agaricus bisporus*, *Pleurotus spp*, *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* (GOMES et al., 2016).

A relevância dos cogumelos como alimento não se deve simplesmente às suas propriedades organolépticas, mas conjuntamente ao abundante conteúdo de substâncias que devem estar presentes em uma dieta humana que traga benefícios a saúde. Eles possuem uma diversidade de biomoléculas com propriedades nutricionais e/ou medicinais, por isso são reconhecidos como alimentos funcionais e como fonte para o desenvolvimento de medicamentos e nutracêuticos (MINGYI et al., 2019; FERRARO et al., 2020).

São atribuídos a estes fungos, uma gama de aplicações biotecnológicas e ambientais pois convertem resíduos orgânicos lignocelulósicos (contendo lignina, celuloses,

hemiceluloses e pectina) em produtos de valor agregado, como alimentos, rações e fertilizantes, enquanto reduzem os níveis de poluição ambiental. (KNOP et al., 2015; SAJON et al., 2018; CORRAL-BOBADILLA et al., 2019).

Seu uso para a promoção e manutenção de um bom estado de saúde e para o tratamento de doenças é devido aos compostos com propriedades biologicamente ativas identificadas, tais como: polissacarídeos, fenóis, glicoproteínas, fibras dietéticas, aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, peptídeos, álcoois, terpenos, esteróis, tocoferóis, ácido ascórbico, dentre outros (LIU et al., 2018; ZHOU et al., 2019, RATHORE et al., 2019; BLUMFIELD et al., 2020; YADAV et al., 2020). O conteúdo destes compostos bioativos depende da espécie, tipo de substrato nutritivo, condições climáticas, idade do micélio, condições de processamento e preservação. Todos esses fatores levam a uma ampla variabilidade no potencial biológico (VENTURELLA et al., 2021).

Essas substâncias bioativas supracitadas têm efeitos biológicos valiosos, tais como efeitos imunomoduladores (ZHAO et al., 2020), hepatoprotetores (ZHANG et al., 2020), anticancerígena (LIN et al., 2017) anti-hipercolesterolemia (RAMAKRISHNAN et al., 2018), anti-inflamatórias (SOUILEM et al., 2017; ABREU et al., 2019), antivirais (ROY et al., 2020), antioxidantes (KIMATU et al., 2017; AKATA et al., 2019), antitumorais (PANDYA et al., 2019) e antimicrobianas (ÖZDAL et al., 2019; OLI et al., 2020).

## 2.2 Bioatividades dos cogumelos

Os cogumelos produzem uma ampla gama de metabólitos secundários com alto valor terapêutico que são explorados para a produção de importantes fármacos. Ambos os corpos frutíferos e o micélio contêm esses compostos. Alguns dos medicamentos e fungicidas que foram desenvolvidos a partir de metabólitos secundários de fungos incluem antibióticos (penicilinas, cefalosporinas e ácido fusídico), agentes antifúngicos (griseofulvina, estrobilurinas e equinocandinas), agentes de redução do colesterol, tais como derivados de estatina (mevinolina, lovastatina e sinvastatina) e drogas imunossupressoras (ciclosporina) (ALY et al., 2011; KOZLOVSKII et al., 2013; WÖSTEN, 2019).



### 2.2.1 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas com capacidade de agir sobre fungos ou bactérias inibindo o seu crescimento ou causando a sua morte (SÁEZ-LLORENS et al., 2000). Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando detêm o crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010).

O primeiro metabólito fúngico com eficácia comprovada foi a penicilina, descoberta em 1928, produzida pelo fungo *P. chrysogenum*, com capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Com esta descoberta, houve um avanço importante na história médica moderna, dando início à exploração de micro-organismos como fonte de substâncias biologicamente ativas, com ênfase na busca de novas substâncias com atividade antibiótica (TOMARAS & DUNMAN, 2015).

Os antibióticos agem de várias maneiras, interferindo nos processos metabólicos ou nas estruturas do organismo. O mecanismo de ação está relacionado principalmente com interferências na síntese da parede celular, modificação da permeabilidade da membrana plasmática, interferências na replicação cromossômica ou na síntese proteica (ALVES et al., 2013; DEGHAN et al., 2017).

O aumento na incidência de novas doenças infecciosas e a resistência dos microrganismos aos medicamentos atuais motivou uma grande necessidade em descobrir novos compostos químicos com atividade antimicrobiana e, possivelmente, com novos mecanismos de ação. Assim, a busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas é importante, sendo os produtos de origem natural uma rica fonte de pesquisa (LIMA et al., 2016).

Os cogumelos possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas, seus extratos possibilitaram isolar e identificar várias substâncias ativas contra microrganismos, podendo modular a resposta imunitária do hospedeiro (TANAKA et al., 2015). Dentre as substâncias com ação antimicrobiana estão os compostos fenólicos, polifenóis, fenóis, flavonoides, ácidos gálicos, sesquiterpenos, terpenos, esteroides e antraquinonas (BACH, 2017). Além dos compostos citados, vários trabalhos descrevem a atividade antimicrobiana desses fungos a partir de seus extratos, muitas vezes sem determinar o composto bioativo.

Os extratos aquosos de cogumelos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e antifúngica, juntamente com uma ação antiaderente (KLANCNIK et al., 2017). OZDAL et al., (2019) obtiveram extratos da massa micelial de espécies de *Pleurotus*, e constataram que a mesma teve atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Além disso, os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que os extratos foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Helicobacter pylori*. Os autores sugerem que os extratos obtidos podem ser utilizados na formulação de nutracêuticos.

### 2.2.2 Antioxidante

As oxidações são reações essenciais nos processos biológicos de muitos organismos, garantindo a produção de energia para alimentar processos biológicos, regulando o crescimento celular e inibindo vírus e bactérias (CHEN et al., 2016). Os radicais livres são produzidos normalmente no metabolismo natural de células aeróbias, principalmente na forma de espécies reativas de oxigênio. Os estudos relacionados à atividade antioxidante são de grande importância frente ao estresse oxidativo que acarreta prejuízos às células como a oxidação de lipídios de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. No entanto, a produção excessiva dos radicais livres pode estar relacionada com o envelhecimento e doenças como o o câncer e aterosclerose (GASECKA et al., 2016).

O corpo humano, assim como em outros organismos aeróbicos, possui mecanismos de defesa antioxidante e sistemas de reparo que evoluíram para protegê-los contra o dano oxidativo, mas esses sistemas não são suficientes para impedir os danos (CRAFT et al., 2012). No intuito de diminuir prejuízos, é necessário então enriquecer a dieta com alimentos e/ou suplementos antioxidantes para ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos, aumentando as defesas naturais das células e eliminando as espécies de radicais livres (RADZKI et al., 2016). Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que são capazes de impedir ou atrasar as taxas de oxidação, pois neutralizam radicais livres, devido a capacidade de doarem elétrons que eles precisam (LACERDA, 2018). Podem

apresentar grande vantagem para a melhoria da qualidade de vida, prevenindo o aparecimento de doenças.

As propriedades de eliminação de radicais livres e antioxidantes do conteúdo fenólico dos extratos de cogumelos têm sido relatadas, sugerindo possíveis papéis protetores destes compostos, devido à sua capacidade para capturar os metais e eliminar os radicais livres (OYETAYO, 2009). Os compostos antioxidantes podem ser isolados do corpo de frutificação, do micélio e do próprio caldo de fermentação.

No geral, diversos estudos com o cogumelo *in natura* e com os extratos comprovam sua atividade antioxidante, servindo como ingredientes potencialmente bioativos para uso na formulação de alimentos funcionais, bem como antioxidantes naturais em sistemas alimentares (KOUTROTSIOS et al., 2017; SHARIF et al., 2017). Por isso, o aumento do consumo de fontes naturais de antioxidantes e os estudos dos compostos que possuem essa atividade têm sido cada vez mais observados (SHASHIDHAR et al., 2017). Os principais compostos isolados de cogumelo com propriedades antioxidantes são os fenólicos, polifenóis, terpenos e flavonóides. (KAEWNARIN et al., 2016; KIMATU et al., 2017; ELKHATEEB et al., 2019).

Assim como a identificação dos compostos bioativos é influenciada por diversos fatores, a avaliação da ação antioxidante destes compostos pode ser feita por diversos métodos *in vitro*, cada um com suas particularidades. As reações de oxidação e redução são muito sensíveis ao meio no qual elas ocorrem já que os alimentos são matrizes complexas levando, muitas vezes, a resultados contraditórios na avaliação de um único antioxidante, utilizando-se diferentes sistemas *in vitro* (SILVA & JORGE, 2011).

Muitos ensaios têm sido desenvolvidos para analisar a capacidade antioxidante de diferentes amostras, devido a diversidade da estrutura química dos compostos antioxidantes e de seus mecanismos de ação (CAETANO, 2009). Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. Esses testes são chamados ensaios de captação. Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, normalmente para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (*Electron Spin Resonance*) ou outra mudança mensurável. A presença de

antioxidantes modifica esses sinais, o que assente sua análise quantitativa (VASCONCELOS et al., 2007).

Com base nas reações químicas envolvidas, os métodos para determinar a capacidade antioxidante podem ser baseados na transferência de átomo de hidrogênio ou na transferência de elétrons. Os métodos mais utilizados, que avaliam a transferência de átomo de hidrogênio são: o ABTS ((2,2'-azino-bis-)3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico), o ORAC (capacidade de absorção de radical oxigênio), o TRAP (potencial antioxidante reativo total) e a capacidade de inibição da peroxidação lipídica. Enquanto que os métodos que avaliam a transferência de elétrons são: o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), o FRAP (potencial antioxidante de redução do ferro) e o TEAC (capacidade antioxidante equivalente em Trolox) (HAMINIUK et al., 2012).

### 2.3 Gênero *Pleurotus*

Os fungos do gênero *Pleurotus* são classificados como pertencentes ao filo Basidiomycota, classe Basidiomycetes, ordem Agaricales e família Pleurotaceae. São conhecidos popularmente como cogumelos ostra, e podem ser encontrados em florestas temperadas, tropicais e subtropicais. Possuem basidiomas normalmente grandes e carnosos, além de uma grande variedade de cores que se alteram de acordo com a espécie, incidência de luz durante a frutificação, necessidades nutricionais, tempo de incubação e temperatura (BONATTI et al., 2004; BERNARDI & NASCIMENTO, 2011).

São conhecidos como fungos de podridão-branca e clivam celulose, hemicelulose e lignina de madeira. Tem a habilidade de colonizar e degradar uma variedade de resíduos lignocelulósicos, com ciclo relativamente curto em comparação a outros gêneros, além de alta adaptabilidade de crescimento em uma variedade de resíduos agrícolas e/ou agroindustriais (ADEBAYO & MARTINEZ-CARRERA, 2015; RAMAN et al., 2018; ZOU et al., 2020).

A maioria dos cogumelos pertencentes a esse gênero são comestíveis e possuem um alto teor de proteínas, carboidratos, aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, minerais e vitaminas, bem como baixo teor de gordura (SOUZA et al., 2016; GOLAK-SIWULSKA et al., 2018).

Componentes extraídos do micélio, do basidioma, ou mesmo metabólitos secretados no meio de cultivo contém diferentes grupos de compostos, tais como os terpenóides, lactonas, ácidos orgânicos, esteróides, polifenóis, tocoferóis, flavonóides, fenólicos, alcaloides e polissacarídeos. Estes compostos possuem atividades antioxidantes (MAITY et al., 2021), anti-hipertensivas (ABDULLAH et al., 2012), antivirais ((VLASENKO et al., 2020), gastroprotetoras (YANG et al., 2012), hipoglicêmica (REN et al., 2014), antitumorais (SUN et al., 2017), antimicrobianas (MORRIS et al., 2017), imunomoduladoras (VETVICKA et al., 2019), anti-inflamatórias (KUSHAIRI et al., 2020) e são responsáveis pelas propriedades funcionais e medicinais de *Pleurotus* spp.

#### 2.4 *Pleurotus ostreatoroseus*

*Pleurotus ostreatoroseus* Singer (Figura 1), é um cogumelo comestível que cresce bem em temperaturas superiores a 20 °C, e se destaca por sua característica coloração rosada e excelente sabor do corpo de frutificação. Está incluída entre os fungos da podridão branca pelo seu excelente potencial na degradação de lignina. Trata-se de uma espécie com véu ausente, lamelas não intervenosas, metulóides ausentes, camada cortical de píleo com elementos de parede lisa, esporos geralmente cilíndricos e basidioma carnoso (PUTZKE, 2002; ROSADO et al., 2002). *P. ostreatoroseus* pertence à ordem Agaricales, Família Pleurotaceae (Polyporaceae) (PEREIRA & PUTZKE, 1989).

Figura 1: *Pleurotus ostreatoroseus*. Fonte: Barbosa, 2019



É uma espécie explorada no cultivo com significativa importância gastronômica, podendo ser cultivada em diferentes substratos formulados à base de resíduos da agroindústria, com o intuito de obter informações direcionadas sobre o conhecimento das melhores condições de crescimento, cultivo e produtividade da espécie (FONSECA et al., 2014; MACHADO et al., 2017; PUTZKE et al., 2020).

Carbonero et al., (2006) isolaram  $\beta$ -glucanos do corpo de frutificação *P. ostreatoroseus*. Os  $\beta$ -glucanos de basidiomicetos são uma importante classe de polissacarídeos com potencial para atividades biológicas e há um grande interesse nessas moléculas, uma vez que tais glucanos têm atividade antitumoral e atividade anti-inflamatória, sugerindo que parte do valor medicinal de *Pleurotus spp.* pode ser atribuído a eles.

Fonseca et al., (2014) avaliaram a produção e caracterização parcial de proteases do extrato bruto de *P. ostreatoroseus* cultivado em substratos agroindustriais. Os resultados demonstraram que os resíduos foram fontes para a produção de proteases com pH variando de levemente ácido a alcalino e temperatura ótima a 25 °C e 40 °C.

Fonseca et al., (2015), relataram que *P. ostreatoroseus* produzido em casca de cupuaçu suplementada com farelo de arroz, apresentou teores importantes de proteínas (25,53%) e fibras (12,79%) e baixa quantidade de gordura (3,08%). Além da presença de aminoácidos essenciais e não essenciais e minerais como zinco (78,06 mg/Kg), ferro (72,34 mg/Kg), potássio (24,19 g/Kg) e fósforo (10,39 g/Kg).

Correa et al., (2015) investigaram a presença de compostos hidrofílicos e lipofílicos, bem como as atividades antioxidante, antiinflamatória e antimicrobiana de formulações (extratos etanólicos) preparados com corpos frutíferos e micélios de cultura submersa. As formulações bioativas contêm pelo menos cinco açúcares livres, quatro ácidos orgânicos, quatro compostos fenólicos e dois tocoferóis. A formulação baseada no corpo de frutificação revelou maior atividade antioxidante de remoção de DPPH, inibição do branqueamento de  $\beta$ -caroteno do que a preparação baseada em micélio, bem como maiores atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas. *P. ostreatoroseus* possui atividade bactericida contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter cloacae*; e ação

fungicida contra fungos *versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum* e *Penicillium verrucosum*. A ausência de hepatotoxicidade foi confirmada em células primárias de fígado suíno. Essas respostas funcionais podem estar relacionadas aos níveis de componentes bioativos, incluindo ácidos fenólicos, ácidos orgânicos e tocoferóis. Este foi primeiro relato de propriedades anti-inflamatórias de extrato de corpo e micélio de *P. ostreatoroseus* e, a partir dos resultados obtidos, um claro potencial anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano das amostras testadas pode ser inferido.

Reis e Rocha (2016) analisaram os efeitos de extratos aquosos dos cogumelos *P. ostreatoroseus* e *Lentinula edodes* sobre o desenvolvimento vegetativo de *Aspergillus nidulans*. As análises indicaram que estes extratos são capazes de modular a expressão de genes responsáveis pelo desenvolvimento vegetativo em *Aspergillus nidulans*. E ao comparar os cogumelos analisados, constatou-se de que *P. ostreatoroseus* promove efeito biológico sobre *Aspergillus nidulans* de maneira superior a *Lentinula edodes* nos parâmetros testados.

Machado et al., (2017) objetivaram produzir e caracterizar proteases de um biocompósito a partir da biomassa micelial cultivada em tubérculos amazônicos. Eles observaram que houve uma maior atividade proteolítica no extrato bruto de *P. ostreatoroseus* cultivado em *Dioscorea alata*. As enzimas mostraram atividades ótimas a 40 °C e pH 7,0; e estabilidade a 50 °C e pH 8,0. As proteases foram classificadas como proteases de cisteína com base no efeito dos inibidores utilizados.

Brugnari et al., (2018) avaliaram a capacidade antioxidante, a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do extrato aquoso de *P. ostreatoroseus*, que foi cozido. Os dados mostraram que, após ser cozido e digerido, o extrato obtido manteve atividade antioxidante e possuiu baixo efeito citotóxico. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* foram sensíveis ao extrato testado. As bioatividades encontradas neste estudo são importantes porque apoiam a inclusão do cogumelo *P. ostreatoroseus* na dieta, pois suas atividades podem ajudar a prevenir algumas doenças, como aquelas relacionadas à deficiência do sistema antioxidante endógeno.

Barbosa et al., (2020) avaliaram a produção e caracterizaram as proteases sintetizadas por *Pleurotus ostreatoroseus*. O substrato promissor na síntese de proteases foi o resíduo de processamento de açaí suplementado com farelo de arroz. Nas condições

experimentais, as proteases apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e a 40 °C, classificadas como serinoprotease e aspartoprotease. A ação destes biocatalisadores é fortemente inibida por  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ . Com essas características, proteases desse cogumelo têm potencial para uso na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

## 2.5 Identificação molecular

Para alcançar uma identificação satisfatória, geralmente é necessário combinar mais de uma técnica e ter informações prévias sobre o grupo taxonômico com o qual se está trabalhando. A maior parte dos métodos convencionais para identificar os fungos é baseada na morfologia. No entanto, por estes métodos possuírem diversas limitações, tornou-se necessário a utilização de técnicas moleculares para identificações mais precisas. Os métodos de biologia molecular são altamente específicos e complementam os métodos morfológicos (RAJA et al., 2017).

Técnicas moleculares, por meio da análise de DNA, possuem a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível, além disso, não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo. Eles são baseados na variabilidade de sequências de DNA de espécies intimamente relacionadas e têm sido aplicados na identificação de espécies de fungos desde a década de 1990 (WHITE et al., 1990; BRUNS et al., 1991).

As sequências genômicas que compõem o DNA ribossômico (rDNA) têm sido utilizadas com sucesso para a classificação e identificação de fungos. O rDNA é altamente conservado, e é formado pelos genes 18S, 5.8S e 28S e duas regiões espaçadoras intergênicas variáveis denominadas espaçador interno transcrito (ITS). Esses genes fazem parte de um agrupamento repetido em tandem intercalados com regiões espaçadoras transcritas e não transcrita. As regiões intergênicas transcrita são separadas em sub-regiões designadas ITS1, ITS2, as quais flanqueiam o gene 5.8S ribossomal (BRUNS et al., 1991; LINDAHL et al., 2013). Devido a sua facilidade em amplificação e uso generalizado, o ITS foi escolhido como código de barras oficial para fungos (SCHOCH et al., 2012).



Para os basidiomicetos, alguns pesquisadores utilizaram os *primers* para os domínios variáveis do gene rRNA 28S associados às regiões ITS 1 e 2 para a identificação das espécies (RUNGJINDAMAI et al., 2008; SINGH et al., 2013). No entanto, quando essas regiões têm baixa resolução para discriminar espécies outros genes como a beta-globulina e da citocromo-oxidase, ainda podem ser usados para identificar as espécies, mas depende de cada caso (RAJA et al., 2017).

A técnica molecular mais utilizada em fungos é a amplificação de domínios polimórficos do cistron ribossômico por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Várias técnicas também têm sido utilizadas para validar as espécies, como SSR (Single Seed Descendent), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), sequências da subunidade menor do RNA mitocondrial e os genes da citocromo-oxidase (AVIN et al., 2014; MIDORIKAWA et al., 2018).

O êxito no sequenciamento dessas regiões tem possibilitado uma nova prospectiva para o conhecimento da biodiversidade fúngica (FIERER et al., 2012; MYROLD et al., 2014). O método baseado na classificação e identificação de sequências permite a detecção rápida e detalhada da diversidade, e a fiabilidade das análises depende das bases de dados de informação, e uma interpretação cuidadosa dos dados (COSTELLO et al., 2013; LINDAHL et al., 2013; NGUYEN et al., 2015; NILSSON et al., 2019). O GenBank (BENSON et al., 2015) é o mais abrangente e amplamente utilizado repositório de sequências para a identificação de fungos, incluindo milhões de sequências de diferentes biomarcadores fúngicos.

## 2.6 Sequenciamento do genoma de fungos

Sanger et al., (1977) publicaram dois trabalhos que iniciaram uma completa revolução na biologia com o desvendamento da sequência completa de genes e genomas (SANGER et al., 1977a; SANGER et al., 1977b). Em um desses trabalhos, o genoma completo do fago *phi* X174 era apresentado; tendo sido esse o primeiro genoma de um organismo a ser completamente desvendado por seres humanos. Sanger abriu as portas para

toda a análise informacional em ciências genômicas e mostrou que era definitivamente possível compreender genomas (STEINDORFF, 2016).

Em 2005 com o advento das plataformas de sequenciamento de próxima geração, ou *Next-Generation Sequencing* (NGS), houve um crescimento exponencial de novas sequências de genomas de todas as classes de seres vivos. Essas plataformas são responsáveis pelo aumento da cobertura do genoma, por leituras de DNA cada vez mais acuradas, pela redução no tempo de corrida, pela facilidade em sequenciar genomas completos e pela redução significativa no custo por sequenciamento (METZKER et al., 2010; ELMETWALLY et al., 2013).

As NGS mais usadas atualmente para estudos do genoma são: Illumina (HiSeq 2500) e Pacific Biosciences (PacBio RS II). Cada uma delas oferecem novas abordagens para o sequenciamento de DNA e tem vantagens e desvantagens com relação a aplicações específicas. A tecnologia Illumina tem se destacado por proporcionar protocolos de preparação de bibliotecas compatíveis com todos os sistemas, mais alta taxa de transferência de dados entre todas as plataformas e menor custo por base (PORTO, 2016).

A cada ano a plataforma Illumina passa por otimizações, resultando em novos kits e equipamentos de sequenciamento com diferentes características, que se adaptam às necessidades experimentais. Fundamenta-se na química de sequenciamento-por-síntese (SBS), que utiliza nucleotídeos terminadores reversíveis marcados por fluorescência. O resultado final é o sequenciamento base a base, proporcionando dados mais precisos, sendo as leituras realizadas pela intensidade do sinal medido, durante cada ciclo, o que também reduz a taxa de erro (DIAZ-SANCHEZ et al., 2013; STEINDORFF, 2016).

Após o advento do genoma humano e também de vários outros genomas de plantas e microrganismos, iniciou-se uma nova era biológica. Utilizando diferentes plataformas, diversos genomas fúngicos foram sequenciados, incluindo organismos modelo, como *Neurospora crassa* e *Aspergillus fumigatus* (GALANAGAN et al., 2003; NIERMAM et al., 2005); fitopatógenos importantes, como *Magnaporthe grisea* e *Fusarium graminearum* (DEAN et al., 2005; CUOMO et al., 2007); patógenos humanos, como *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii* (LOFTUS et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2014). Até o presente momento, estão depositados na base de dados do NCBI os genomas de 7673 fungos,

sendo que desse total 9 correspondem a cogumelos do gênero *Pleurotus* (dados de janeiro de 2021).

A disponibilidade das sequências do genoma de fungos facilitou a pesquisa da diversidade genética e a identificação de genes envolvidos na biossíntese de metabolitos secundários pela mineração do genoma (CORRE e CHALLIS, 2009). Os genomas de fungos em geral são complexos para sequenciar e montar devido ao conteúdo repetitivo e o grande tamanho do genoma (CRISTANCHO et al., 2014).

As três espécies de cogumelos comestíveis mais comercializados no mundo já tiveram seus genomas sequenciados, o *Agaricus bisporus* (MORIN et al., 2012; SONNENBERG et al., 2016), o *Lentinula edodes* (SHIMA et al., 2013), o *Pleurotus ostreatus* (RILEY et al., 2014), além de outros como o *Volvariella volvacea* (BAO et al., 2013) e *Flammulina velutipes* (KURATA et al., 2016); assim como alguns cogumelos medicinais como o *Ganoderma lucidum* (CHEN et al., 2012; LIU et al., 2012), *Wolfiporia cocos* (FLOUDAS et al., 2012), *Daedalea quercina* (NAGY et al., 2016), *Ophiocordyceps sinensis* (LI et al., 2016) e *Hericium erinaceus* (GONG et al., 2020). O sequenciamento do genoma e a anotação funcional contribuem com elucidações úteis para a determinação de marcadores genéticos chaves que são capazes de aprimorar a qualidade e o uso dos cogumelos (YUAN et al., 2017).

Apesar da importância na descoberta de drogas, a maioria das espécies de macrofungos devido à falta de genomas de referência tem o desenvolvimento de novas pesquisas limitado. Uma vez que alguns genomas de macrofungos foram relatados (YAP et al., 2014; NAGY et al., 2016; YU et al., 2019; LEE et al., 2020; KUI et al., 2021), muitos projetos grandes que visam o sequenciamento de genomas fúngicos estão em andamento. Li et al., (2018) publicaram o genoma de 90 fungos (83 espécies de Basidiomicetos e 7 espécies de Ascomicetos), sendo a maioria de cogumelos silvestres comestíveis, até agora, esse é o maior conjunto de dados genômicos para espécies de macrofungos.

O conjunto de dados do genoma é uma ferramenta útil para várias investigações moleculares, promovendo pesquisas nas áreas científica, farmacêutica, nutracêutica, cosmeceutica e agrícolas. Também dá suporte a investigação de características fisiológicas, diferenças morfológicas, análises evolutivas e metabólicas em genômica comparativa,

fornecendo evidências para a genética de populações de muitas espécies de fungos (LI et al., 2018).

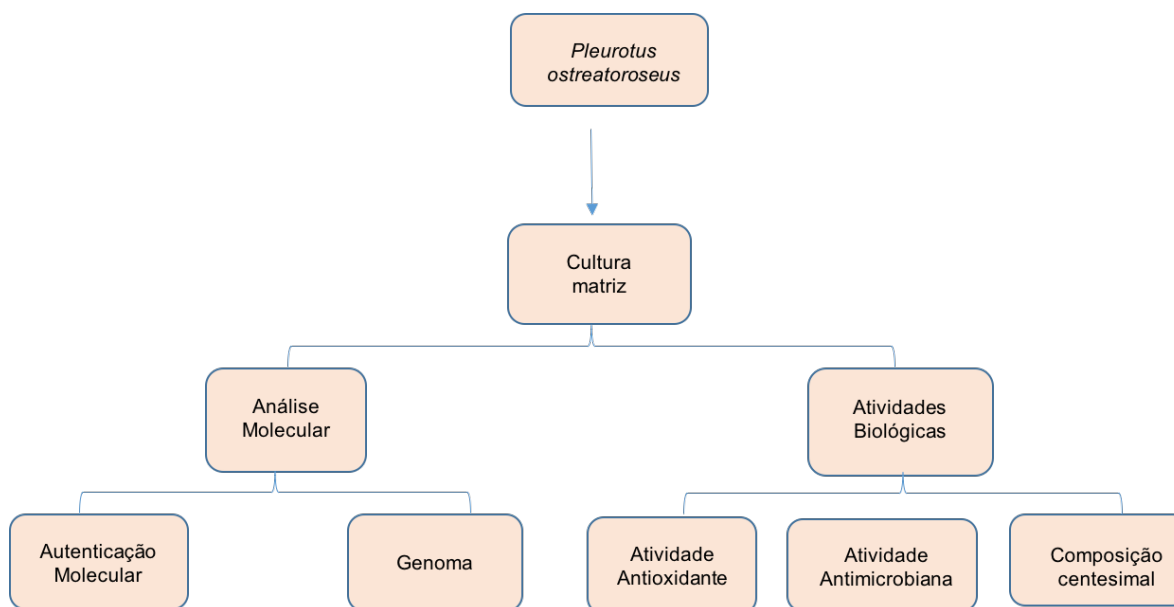
Pesquisadores procuram identificar genes putativos que podem estar envolvidos na biossíntese de proteínas e polissacarídeos bioativos, para desenvolver recursos genômicos fundamentais para as espécies de cogumelos que pode ser usado em pesquisas futuras. A disponibilidade de várias sequências genômicas publicadas permite a obtenção de *insights* sobre o genoma dos cogumelos por meio de análises comparativas. Também as pesquisas trazem as anotações funcionais (COG, GO e KEGG), fornecendo informações sobre o metabolismo secundário e o metabolismo de carboidratos.

Um dos aspectos mais importantes na busca de informações biológicas em um contexto genômico é a associação das sequências de DNA com as suas respectivas funções biológicas. O sequenciamento do genoma e a anotação funcional fornecem informações valiosas para determinar a função potencial e os mecanismos de expressão do gene, que podem fornecer a base teórica para o cultivo e reprodução desses fungos. (YU et al., 2019). Até onde sabemos, todos os dados de sequenciamento, montagem e anotação do genoma de novo representam a primeira montagem em escala do genoma de *Pleurotus ostreatoroseus*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A autenticação molecular de *Pleurotus ostreatososeus*, informações sobre o sequenciamento do genoma, bem como a determinação da composição centesimal da biomassa e atividade antimicrobiana e antioxidante por meios de ensaios *in vitro* foram executados de acordo com o fluxograma a seguir (Figura 2).

Figura 2: Delineamento experimental



#### 3.1 Reativação da linhagem *Pleurotus ostreatososeus* DPUA 1720

*Pleurotus ostreatososeus* DPUA 1720, foi cedido pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). A reativação da cultura, preservada em óleo mineral, foi realizada pela transferência de fragmentos do micélio para o meio Ágar Batata Dextrose (BDA) suplementado com extrato de levedura 0,5% (p/v) em placas de Petri. Os cultivos foram mantidos a 25 °C, na ausência de luz por oito dias. Após esse período, as culturas foram mantidas em placas de Petri contendo meio BDA para continuação dos experimentos.

## 3.2 Identificação molecular

### 3.2.1 Extração do DNA

A cultura pura obtida do isolado de *P. ostreatoroseus* foi crescida em triplicata, em Erlenmayer de 250 mL contendo 100 mL de meio extrato de malte (25 g de extrato de malte/ 1 L de água). Foram adicionados aos Erlenmeyers 5 discos de micélio, com tamanho aproximado de 7 mm, levados a incubadora-agitadora, submetidos a rotação de 150 rpm a temperatura de 28 °C. Após quatro dias, a massa micelial foi obtida para a extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada conforme método descrito por Mota & Nobrega (2013), com modificações. A massa micelial foi lavada com água esterilizada e depois centrifugada por 2 minutos a 16.833 g, por três vezes, seguida de descarte do sobrenadante. Foram adicionados a um microtubo, a massa micelial, 400 µL TE (100 mM de Tris-HCL, 50 mM de EDTA, pH 8) e 300 mg de esferas de vidro (diâmetro 0,5 mm) e processados em um homogeneizador Beadbug (*Benchmark Scientific*) por 30 segundos para a quebra da parede celular. Imediatamente, foram adicionados 400 µL de tampão de lise (concentrações finais: 100 mM de Tris-HCL, 50 mM de EDTA, pH 8, 50 mM DTT, 1 mg/mL proteinase K e 1% SDS), e as amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C em banho-maria. Após este período, foram adicionados aos microtubos, acetato de potássio 5 M (v/v), incubados por 30 minutos a -20 °C e em seguida centrifugados por 10 minutos a 10.000 g. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, adicionado igual volume de isopropanol e seguida de incubação a -20 °C por 15 minutos. Logo após, foi centrifugado a 16.833 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado lavado 1 vez com 500 µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 16.833 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram levadas ao banho seco a 50 °C, para a evaporação completa do etanol. O DNA foi reidratado com 30 µL de TE-RNase (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 µg/mL RNase) e incubado por 30 minutos a 37 °C.

### 3.2.2 Pureza, quantificação e integridade do DNA

A pureza do DNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*, USA). A pureza da amostra foi analisada por meio das absorbâncias (260/230), para avaliar a pureza em relação aos compostos inorgânicos e (260/280), para avaliar a pureza em relação às proteínas. A integridade e quantificação do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, visualizadas em um transluminador ultravioleta Quantum (*Vilber Lourmat*) e comparadas com a intensidade de concentrações do marcador *phago λ* (*Invitrogen*).

### 3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações foram realizadas com o conjunto de reagentes GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (*Promega*), num termociclador ProFlex-PCR System (*Applied Biosystems by LifeTechnologies*). Para a amplificação da região gênica 18S, 5,8S, ITS 1, ITS 2 e parte do 28S (Figura 3) foram utilizadas as sequências de oligonucleotídeos que estão na Tabela 1. Para o volume final de 25 µL foram utilizados: 1X tampão de PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM de cada iniciador, 10 ng de DNA genômico, 0.125 µL de Taq DNA polimerase 5 U e o volume final completado com água ultrapura. A PCR ocorreu nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão inicial a 72°C por 3 minutos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Figura 3: Representação física dos amplicons correspondentes as regiões 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e D1/D2 do gene 28S com seus respectivos oligonucleotídeos.

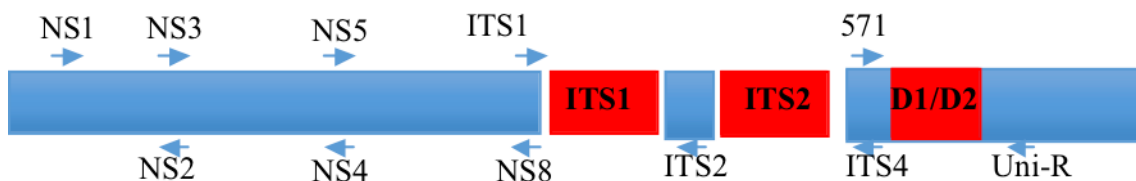


Tabela 1: Sequência dos iniciadores

Primer	Código	Sequência	Referência
NS3	608	5' - GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC - 3'	WHITE et al., 1990
NS4	611	5' - CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG - 3'	
NS5	610	5' - AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G - 3'	
ITS3	350	5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC - 3'	
ITS4	351	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'	
UNI-F	571	5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG- 3'	FELL, J.W, 1993
UNI-R	572	5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG - 3'	FELL, J.W, 1993

Após a confirmação do tamanho esperados dos amplicons obtidos, os produtos da PCR foram purificados utilizando o PuriLink™ PCR Purification Kit (*Invitrogen by LifeTechnologies*), de acordo com o protocolo do fabricante e armazenados a -20°C.

### 3.2.4 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento por terminação de cadeia foi realizada com volume final de 10 µL, sendo 0.5 µL de *BigDye Terminator (v3.1)* (*Applied Biosystems*), 2 µL de 5X tampão para sequenciamento, 20 ng de *amplicon* e 0.3 µM de cada iniciador e água ultrapura q.s.p. A termociclagem foi realizada em um termociclador *ProFlex-PCR System* (*Applied*



*Biosystems by LifeTechnologies*), nas seguintes condições: 96 °C 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 95 °C 15 segundos, 55 °C 15 segundos, 60 °C 2 minutos.

### 3.2.5 Purificação da reação de sequenciamento

A purificação do produto da reação de sequenciamento foi feita adicionando-se 4 µL da solução NG (1 mg.mL<sup>-1</sup> de glicogênio dissolvido em NH<sub>4</sub>OAc 5 M) e 40 µL de etanol absoluto, homogeneizando a mistura por inversão e em seguida mantida a -20 °C por 30 minutos. A placa com o material foi centrifugada em velocidade máxima em centrífuga de bancada equipada com rotor de placas (*Thermo Scientific: Heraeus Megafuge 8R*) a 4 °C por 40 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e a placa foi levada invertida a centrífuga para um pulso de 300 rpm. O precipitado foi lavado duas vezes com 110 µL de etanol 70% (Merck) com centrifugação entre as lavagens e descarte por inversão. A cada descarte, foi dado um pulso de 300 rpm com a placa invertida na centrífuga para desprezar qualquer resquício de álcool. A placa permaneceu em temperatura ambiente por alguns minutos para secagem do precipitado final. O material foi ressuscitado em 10 µL formamida, submetido à desnaturação por 5 minutos a 95 °C seguido de um rápido esfriamento no gelo. As amostras foram injetadas em um Analisador Genético por eletroforese capilar modelo ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

### 3.2.6 Processamento das sequências

As sequências no formato .ab1 foram editadas no programa *Geneious* (v. 9.1.8). Para fins de identificação, as sequências obtidas foram confrontadas com os dados do banco de sequências nucleicas (nt) (*GenBank, DDBJ, EBI*), utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990), configurado na opção “blastn” (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db>).

### 3.3 Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

O sequenciamento, montagem e anotação do genoma foi realizado pela empresa *Genone Biotechnologies*. O DNA extraído (conforme o protocolo descrito acima) foi enviado

para a empresa, liofilizado, na concentração de 3 µg, cumprindo os parâmetros de integridade e pureza exigidos.

O sequenciamento do DNA genômico foi realizado utilizando a plataforma Illumina NovaSeq6000. A biblioteca genômica (*paired end* com tamanho de 150 pb) foi contruída utilizando o kit NEBNext® Ultra™ II DNA Library para Illumina® (*New England Biolabs*), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para avaliar a qualidade dos *reads* gerados pelo sequenciamento, foi utilizado o *software* fastp v0.20, em que *reads* ambíguos, de baixa qualidade e com menos de 38 nucleotídeos foram descartados. Os *reads* de qualidade foram utilizados, para montagem do genoma, usando o *software* SOAPdenovo2 (v.2.04) (LI et al., 2009), onde foram agrupados em *contigs* e *scaffolds*. Por meio do *software* Funannotate v1.6.0 (PALMER, 2019), usando RepeatModeler v1.0.11, RepeatMasker v4.0.7 identificou-se os elementos repetitivos. O RepeatMasker rastreia elementos repetitivo em sequências de DNA por meio da comparação contra bibliotecas de repetições de espécies com genoma conhecido armazenado em banco de dados. O RepeatModeler emprega métodos computacionais *de novo* para a identificação e modelagem de famílias de repetição. Os RNAs foram previstos pelos tRNAscan-SE (LOWER & EDDY, 1997), rRNAmmer (LAGESEN et al., 2007), Rfam (GARDNER et al., 2009; NAWROCKI et al., 2009) e pelo programa cmsearch.

A predição do gene foi feita usando o *software* Augustus v3.2.1 (KELLER et al., 2011) combinado com conjuntos de dados OrthoDB v9 (ZDOBNOV et al., 2017), BUSCO v3 (WATERHOUSE et al., 2018), e uma coleção de 798104 sequências transcritas de fungos de NCBI/nucore obtidas por filtragem de fungos/basidiomicetos/mRNA. Foi usado sete bancos de dados: GO (Gene Ontology) (ASHBURNER et al., 2000), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (KANEHISA et al., 2004; 2006), COG (Clusters of Orthologous Groups) (TATUSOV et al., 2003), TCDB (Banco de dados de classificação do transportador) (MILTON et al., 2014), NR (Banco de dados de proteínas não redundantes) (LI et al., 2002), Swiss-Prot (AMOS & ROLF, 2000) e Pfam (<http://pfam.xfam.org>) para anotações genéticas gerais.

A anotação foi realizada por comparação com bancos de dados de sequências de aminoácidos de fungos, que possuem genomas completos anotados utilizando a ferramenta

BLASTx local (valor E menor que  $1e-5$ , porcentagem de comprimento de alinhamento mínimo maior que 40%). Os contigs também foram comparados utilizando os bancos curados de sequências de aminoácidos Refseq, Swiss-Prot contra banco de dados NCBI (banco de dados KOG com o programa BLAST (e-value  $<1e-5$ ). A anotação funcional por termos de ontologia foi analisada pelo *software* BLAST2Go. As vias metabólicas foram obtidas usando o padrão KEGG e banco de dados KOG com o programa BLAST (e-value  $<1e-5$ ). Os *clusters* de gene do metabolismo secundário foi feita por antiSMASH (MEDEMA et al., 2011). Enzimas ativas em carboidratos (CAZy) (LOMBARD et al., 2014) foram previstas pelo banco de dados de enzimas ativas em carboidratos.

### 3.4 Seleção qualitativa de compostos bioativos

Neste experimento foram preparados extratos orgânicos obtidos da massa micelial e dos basidiomas de *P. ostreatoroseus*.

#### 3.4.1 Cultivo submerso para produção de massa micelial

Para obtenção da massa micelial, *P. ostreatoroseus* foi cultivado em Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES), em placa de Petri de 90 mm x 10 mm. Os cultivos foram mantidos a 28 °C por 8 dias. Desde cultivos, foram retirados 5 discos miceliais e transferidos para 50 mL de meio YES líquido em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A fermentação foi conduzida por 8 dias a 28 °C, a 160 rpm. A massa micelial foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo, lavada com água destilada, imediatamente armazenada no freezer e posteriormente liofilizada.

#### 3.4.2 Processamento dos basidiomas

Os basidiomas (10 g) foram gentilmente cedidos pelo Herbário Micológico Jair Putzke, Universidade Federal do Amazonas (DPUA). Eles foram triturados para obtenção de um pó fino.

### 3.4.3 Extração dos compostos

Para obtenção dos extratos orgânicos foi utilizado etanol como solvente extrator (CARVAJAL et al., 2012). A massa micelial previamente liofilizada foi triturada de forma a ser obter granulometria semelhante a do basidioma. As amostras (5 g) foram submetidas a agitação com 100 mL de etanol 70:30 (em água) a 25 °C e a 130 rpm durante 3 h e filtradas por meio do papel Whatman nº 1. O procedimento de extração foi repetido duas vezes. Os filtrados combinados foram concentrados em um evaporador rotativo a vácuo a 40 °C para eliminar o solvente e subsequentemente liofilizar a formulação. Os pós liofilizados foram armazenados no congelador.

### 3.5 Método difusão em ágar por poço ou *cup-plate*

Os extratos orgânicos obtidos (subitem 4.4.3) foram analisados frente a três micro-organismos teste, *Candida albicans* DPUA 1706, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* CBAM 001. A levedura foi cultivada em ágar *Sabouraud* a 25 °C por 48 horas e as bactérias em ágar *Mueller-Hinton*, a 37 °C por 24 horas. Para cada cultura foi preparada uma suspensão celular com densidade equivalente a escala de *MacFarland* 0,5. Como controles positivos foram utilizados Itraconazol e Cloranfenicol (50 µg/mL) para levedura e bactérias, respectivamente (TEIXEIRA et al., 2011). De cada suspensão celular, 100 µL foram semeados na superfície de ágar *Sabouraud* ou ágar *Mueller Hinton*, em placas de Petri (90 mm x 10 mm), formando uma camada uniforme. Em cada poço foi inoculado 100 µL do extrato orgânico e dos controles. As placas foram mantidas a 37 °C por 48 horas (levedura) e 24 horas (bactérias). A atividade antimicrobiana foi expressa em milímetros.

### 3.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A CMI foi realizada de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo, descrita no documento M38-A2 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008), contra os micro-organismos testes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* CBAM 001 e *Candida albicans* DPUA 1706. O teste foi realizado em microplaca de 96 poços, em cada poço foi adicionado 100 µL dos meios caldos *Sabouraud* ou caldo *Müeller-Hinton*. Na coluna 1 da placa multipoço foi colocado o controle negativo (caldo *Sabouraud*

ou Muller Hinton + extrato orgânico) e coluna 2 foi adicionado 100 µL do extrato de maior concentração em solução aquosa de Dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % (v/v). A partir da coluna 2 foram feitas diluições seriadas, transferindo 100 µL da mistura composta por meio+extrato, sucessivamente até a coluna 11 e desta, foi descartado 100 µL.

Em todos os poços exceto a coluna 1 foi inoculado 5 µL da suspensão celular de cada micro-organismo teste, com densidade celular semelhante a escala de MacFarland 0,5. Na coluna 12 (controle positivo) foram adicionados ao meio 50 µL as soluções de Itraconazol ou Cloranfenicol (200µg/mL). As placas multipoços foram mantidas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, 10 µL de solução aquosa do revelador Alamar Blue<sup>®</sup> (resazurina) a 0,1 % (p/v) foram adicionados a todos os poços. Os resultados foram visualizados através da alteração da cor, indicando resistência (vermelho) ou sensibilidade (azul). A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento microbiano em µg/µL (BONA et al., 2014).

### 3.7 Atividade antioxidante

#### 3.7.1 Capacidade sequestrante dos radicais DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>·+</sup>

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados (NANOPOL) da UFAM. A amostra (10 mg/mL) foi solubilizada em etanol P.A. e submetida a análises de capacidade sequestrante dos radicais DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>·+</sup> baseado em metodologias com pequenas modificações para leitura em microplacas (MOLYNEUX, 2004; RE et al., 1999). Para o ensaio de DPPH 10 µL da amostra foi adicionada a 190 µL da solução de DPPH (100 µM), a mistura reacional foi incubada em ambiente escuro por trinta minutos. A leitura das absorvâncias foi realizada em leitora de microplaca a 515 nm (Epoch 2, Biotek). Uma curva padrão de Trolox de 100 a 1500 µM ( $y = -0,0004x + 0,7136$ ,  $R^2 = 0,9983$ ) foi utilizada como padrão. Para o teste de ABTS, 2 µL da amostra foi adicionada a 200 µL da solução de ABTS<sup>·+</sup> (ABS de 0,70), a reação ocorreu em ambiente escuro por seis minutos. A leitura das absorvâncias foi realizada em leitora de microplaca (Epoch 2, Biotek) a 750 nm. Uma curva padrão de Trolox de 62,5 a 2000 µM ( $y = -0,0003x + 0,6689$ ,  $R^2 = 0,9955$ ) foi utilizada como padrão. Os resultados foram expressos em µmol de Equivalentes de Trolox por grama de amostra.

### 3.7.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A determinação de fenóis totais foi baseada na metodologia com pequenas modificações para leitora em microplacas (VELIOGLU et al., 1998). O ensaio consiste na adição da amostra a uma mistura reacional (1:1) do reagente de Folin Cicoalteu e bicarbonato de sódio (6%), mantida no escuro por noventa minutos para posterior análise em Leitora de Microplaca (Epoch 2, Biotek) a 750 nm. A curva padrão de ácido gálico foi feita de 3,9 a 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 0,0057x + 0,0137$ ,  $R^2 = 0,9996$ ) e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

### 3.7.3 Capacidade Redutora de Ferro Total (FRAP)

A determinação da capacidade redutora de ferro total (FRAP) foi baseada na metodologia para leitora em microplacas com pequenas modificações (PULIDO et al., 2000). A amostra (9  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada a 27  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 270  $\mu\text{L}$  de reagente FRAP (tampão acetato 0,3 M,  $\text{pH} = 3,6$ ; solução TPTZ 10 mM e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 20 mM a 10:1:1). Após incubação de 30 minutos a 37 °C, a absorbância foi medida a 595 nm em leitora de microplaca a 750 nm (Epoch 2, Biotek). Os resultados foram expressos em Fe(II) ( $\mu\text{M/g}$ ) com curva de sulfato ferroso de 250 a 2000  $\mu\text{M}$  ( $y = 0,0006x - 0,0342$ ,  $R^2 = 0,9994$ ).

### 3.8 Determinação da composição centesimal da biomassa

O cogumelo *Pleurotus ostreatoroseus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio GYP (20% glicose, 0,5% de peptona e 0,5% de extrato de levedura). A fermentação submersa foi conduzida a 28 °C sob agitação durante 8 dias. Ao término do processo fermentativo a biomassa foi lavada três vezes com água destilada para retirada do excesso de meio, separada por filtração a vácuo em papel de filtro com peso conhecido e liofilizada para avaliação da composição centesimal.

A análise centesimal e o valor calórico da biomassa foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do Pescado I localizado na Faculdade de Ciências Agrárias, sul-Minicampus, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), conforme metodologias oficiais da *Association Official Analytical Chemists* (AOAC, 2006). As amostras foram analisadas em termos de umidade, lipídeos totais, cinza, fibras, proteína bruta e carboidratos

de acordo com o Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). As análises foram realizadas em triplicata.

A umidade foi determinada por dessecação em estufa a 105 °C até peso constante. O conteúdo de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C até os resíduos apresentarem uma coloração cinza claro ou branca.

A determinação de nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl, no qual consiste em decompor a amostra com ácido sulfúrico e um catalisador, onde o nitrogênio é transformado em sal amoniacal. A quantidade de nitrogênio foi determinada titulando-se o excesso do ácido. Para a determinação de proteínas totais foi empregado o seguinte fator de correção: Proteínas (%) = N x 4,38.

O teor de lipídeos foi determinado pelo método Bligh e Dyer (1959). Nesse método são extraídas todas as classes de lipídios sem aquecimento que são obtidos por pesagem.

A determinação do teor de fibra bruta foi obtida a partir da biomassa digerida com solução de ácido sulfúrico 1,25% (v/v), seguida por digestão alcalina com hidróxido de sódio 1,25% (p/v). As amostras foram filtradas à vácuo com papel de filtro e o resíduo resultante da hidrólise foi incinerado em mufla a 550 °C até a formação de cinzas.

O teor de carboidratos totais foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula: C (%) = 100 – (umidade + cinzas + lipídeos + proteínas). O valor calórico foi determinado utilizando-se fatores de conversão de Atwater: 4 Kcal.g<sup>-1</sup> (proteína), 4 Kcal.g<sup>-1</sup> (carboidratos) e 9 Kcal.g<sup>-1</sup> (lipídios), conforme a fórmula: Energia (Kcal) = 4 x proteínas + 4 x carboidratos + 9 x lipídeos.

### 3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Os dados foram comparados por análise de variância (One-Way ANOVA) seguida pelo Teste Tukey com nível de significância de 5% em *software* Minitab® 18.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação Molecular

Não há um único método de lise celular apropriado para todos os fungos e cada método específico almeja uma eficiente extração de DNA (MANIAN et al., 2005). Dada a variedade de protocolos na literatura para extração de DNA de fungos, pode ser difícil selecionar um método adequado para as espécies de interesse. O ideal para um protocolo de extração de DNA é o rendimento máximo que não deve afetar a qualidade e pureza do DNA com contaminantes que podem atuar ao longo das etapas de extração, reduzindo significativamente a sensibilidade da PCR.

O método de extração de DNA utilizado neste trabalho baseado em Nóbrega e Mota (2013) com modificações, proporcionou uma extração de DNA com quantidade e qualidade necessárias para PCR e para o sequenciamento do genoma. Após a extração de DNA, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8% (Figura 4), em seguida foi realizada a PCR para o gene rDNA (Figura 5), purificação da PCR (Figura 6), sequenciamento e comparação dos resultados com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI.

Figura 4: Perfil eletroforético do DNA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. M: Marcador Lambda 10 ng/μL. 1-2: amostras de DNA extraído.

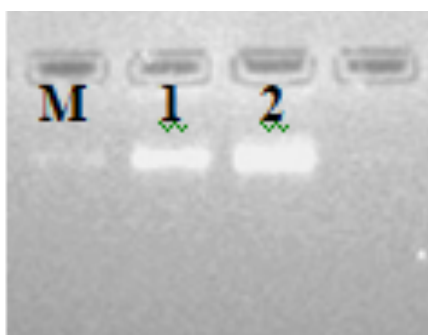




Figura 5: Amplificação do rDNA em gel de agarose 1%. M: Marcador de peso molecular 1kb Plus; 1-3: Produto da PCR amplificados usando os iniciadores 611/572 (1), 571/572 (2), 350/351(3).

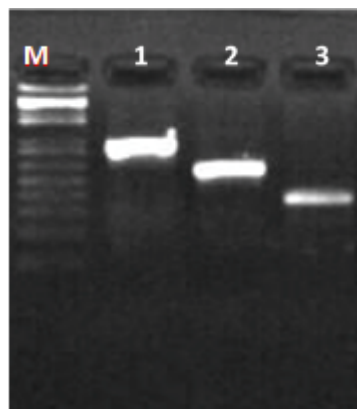
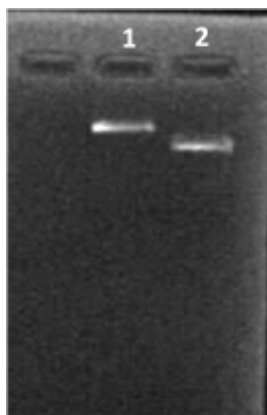


Figura 6: Gel de agarose 1% de produtos da PCR purificados. 1-2: Amostras purificadas.



A similaridade das sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI e são apresentadas na Tabela 2, comparando-se somente com os resultados de sequências de trabalhos publicados.

Tabela 2: Identificação taxonômica de *Pleurotus ostreatoroseus* baseada em máxima identidade a partir do alinhamento de sequências de nucleotídeos.

Linhagem	Análogo filogenético	Genebank ID	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
DPUA1720	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	MG282493.1	20	00	90
DPUA1720	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	MG282434.1	13	2e-98	82

A região interna do espaçador transcrito foi amplificada e sequenciada para confirmar a identidade da espécie (*GenBank accession number* MH915573.1). A análise subsequente pelo BLASTn identificou o isolado como *Pleurotus ostreatoroseus*, mostrando 90% de identidade.

Na Tabela 2, pode-se observar que apenas 20% da sequência submetida ao banco foi efetivamente usada para fins de comparação e que correspondem aos domínios hipervariáveis D1/D2 do gene rRNA 28S. Conseqüentemente, a comparação efetiva foi de 554 bp, resultando em 498 de identidade (90%) e 2 mal pareamentos. As sequências que estão depositadas no GenBank são sequências parciais, por isso resultou em uma cobertura e identidade baixas quando comparado com a nossa sequência.

Os métodos de biologia molecular são altamente específicos e complementam os métodos morfológicos. Eles são baseados na variabilidade de sequências de DNA de espécies intimamente relacionadas e têm sido aplicados na identificação de espécies de fungos desde a década de 1990 (WHITE et al., 1990; BRUNS et al., 1991). As sequências genômicas que compõem o DNA ribossomal (rDNA) têm sido utilizadas com sucesso para a classificação e identificação de fungos.

Schoch et al., (2012) publicaram um estudo de referência, que propôs a região ITS, o código de barras universal para identificação de fungos. Considerando as limitações no uso de ITS, outros biomarcadores, às vezes denominados secundários, têm sido utilizados. O uso combinado de ITS com outros biomarcadores, principalmente 28S e 18S, tem sido

difundido e utilizado em muitos trabalhos de identificação molecular de fungos (BADOTTI et al., 2018).

## 4.2 Sequenciamento e anotação do genoma

### 4.2.1 Sequenciamento e Montagem *de novo*

Os dados brutos do sequenciamento possuem uma certa porcentagem de dados de baixa qualidade. Para garantir a precisão e a confiabilidade da análise de informações, etapas de pré-filtragem foram realizadas para obter dados limpos. A retirada de adaptadores contaminantes e das bases de má qualidade tornou a distribuição mais homogênea para todas as posições dos *reads*. O sequenciamento do genoma utilizando a plataforma NovaSeq600 gerou 18.496 Mbp. Após os cortes de qualidade foram mantidos 16.251 Mbp, e esses foram usadas para montagem das sequências genômicas de *P. ostreatoroseus*. O tamanho do genoma foi estimado depois da revisão por análise de espectro de K-mer com K-mer = 95.

A partir das montagens dos *contigs*, foram analisados parâmetros de eficiência como o número de sequências geradas, tamanho mínimo e máximo dos *contigs* e quantidade (N50) de *contigs* utilizados como demonstrado na Tabela 3. As montagens genômicas são medidas pelo tamanho e precisão de seus *contigs* e *scaffolds*. Os *scaffolds* definem a ordem e a orientação do *contig* e os tamanhos das lacunas que ocorrem entre os *contigs* (MILLER et al., 2010).

A sobreposição dos *reads* resultou em *contigs* com comprimento máximo de 1.071.624 bp e mínimo de 245 bp. Obteve-se um total de 619 *contigs* e um teor de G + C de 52.62% (Tabela 3).

Tabela 3: Estatísticas do genoma de *Pleurotus ostreatoroseus*.

Parâmetros	
Número total (>500 bp) <i>contigs</i>	619
Tamanho maior <i>contig</i> (bp)	1.071.624
Tamanho menor <i>contig</i> (bp)	245 bp
N50 (bp)	180.995
Número total (>500 pb) <i>scaffolds</i>	597
Tamanho do maior <i>scaffold</i> (bp)	1.071.624
Tamanho menor <i>scaffold</i> (bp)	507
N50 (bp)	192.936
GC%	52.62
Tamanho do genoma (Mb)	38.6

Após montagem realizada com o *software* SOAPdenovo2 v2.04, foi obtido o tamanho do maior (1.071.624 bp) e do menor *scaffold* (507 bp), bem como o tamanho total dos *scaffolds*, 338.588.587. O tamanho do genoma foi estimado em 38.6 Mb com sequências repetidas cobrindo 4.65% desse total. A taxa de heterozigosidade foi estimada em 0.06%. A sequência do genoma de *Pleurotus ostreatoroseus* foi depositado em DDBJ / ENA / GenBank sob o número de acesso SWBT00000000. Os dados brutos foram depositados no banco de dados NCBI / SRA com o número de acesso SRR12316382.

O tamanho do genoma de *P. ostreatoroseus* é consistente com os tamanhos dos genomas observados em outras espécies de *Pleurotus* relacionadas, que estão depositados no NCBI. O maior genoma depositado é de *P. eryngii* com 49.92 Mb, seguido por *P. tuoliensis* com 48.23 Mb, *P. pulmonarius* com 42.55 Mb, *P. platypus* com 39.97 Mb, *P. salmoneostramineus* com 39.19 Mb, *P. citrinopileatus* com 36.84 Mb, *P. tuber-regium* com 35.82 Mb e o menor genoma é de *Pleurotus ostreatus* com 35.09 Mb, que possui a melhor qualidade de conjuntos de genomas.

O N50 é um parâmetro utilizado para estimar a qualidade das montagens, calculado pelo ordenamento de todos os *contigs* (do maior para o menor), determinando o conjunto mínimo de *contigs* cujo tamanho total seja 50% de todo o genoma, e que nesse estudo foi de 180.995 bp. Esses valores de N50 são maiores do que de quatro outras montagens de *Pleurotus*: *P. platypus* (N50 = 59.239 bp), *P. tuber-regium* (N50= 55.887), *P. tuoliensis* (N50= 51.043) e *P. citrinopileatus* (N50 = 7.719 bp).

#### 4.2.2 Predição de Componentes do Genoma

Foi usado vários métodos para anotar os genes que codificam proteínas incluindo previsões *de novo* e previsões baseadas em homologia. Para as previsões *de novo*, foi usado o *software* Augustus v3.2.1, e para previsões baseadas em homologia, foram utilizados os *softwares* BUSCO v3, OrthoDB v9 e um conjunto de proteínas de uma coleção de 798.104 sequências de transcrição de fungos do banco de dados NCBI *Nucleotide database*. Um total de 11.296 genes foram previstos com 113.754 exons, 113.748 introns e um comprimento de sequência médio de 1.481 bp. Esses valores estão dentro da faixa de espécies de *Pleurotus*, como *P. ostreatus* (11.603 genes em *P. ostreatus* PC15 e 12.206 em *P. ostreatus* PC9) e *P. eryngii* (15.960 genes ATCC 90797) (LEE et al., 2020).

Tabela 4: Estatística dos genes preditos.

Amostra	Tamanho genoma (Mb)	Número de genes	Comprimento total de genes (bp)	Comprimento médio dos genes(bp)	Comprimento dos genes/Genoma (%)
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	38.6	11.296	13.716.684	1.481	35.55

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são tipos de moléculas de RNA amplamente expressas em procariotos e eucariotos, produzem produtos de RNA funcionais em vez de proteínas e desempenham várias funções biológicas. Esses ncRNAs desempenham papéis importantes no *splicing*, transcrição, tradução e arquitetura da cromatina, e muitos ncRNAs estão associados a doenças (HUANG et al., 2016; WANG et al., 2020).

Os ncRNAs foram identificados por experimentos e métodos computacionais em vários fungos (LIU et al., 2013; LI & BREAKER, 2017; BORGOGNONE et al., 2019).

Existem poucos estudos relacionados ao ncRNA em basidiomicetos e ainda menos em cogumelos comestíveis. QU et al. (2016) desenvolveram o primeiro estudo de identificação em escala de genoma de sncRNAs para um basidiomiceto.

Nas sequências nucleares de *P. ostreatoroseus* foram preditos 244 genes codificantes de RNAs não traduzidos (ncRNAs). Os rRNAs e tRNAs (RNA transportador) foram anotados com programas que fazem uso de modelos específicos para essas famílias de RNAs, capazes de gerar resultados ainda mais precisos que o Blast. O tamanho médio dos tRNAs, rRNAs e snRNAs (small nuclear RNA) anotados foi de 82, 3.210 e 126 bp, respectivamente.

Os ncRNAs desempenham funções importantes na tradução e na regulação da expressão gênica e investigações desses genes, assim como a anotação dos genes codificadores de proteínas, são importantes para a exploração global do genoma e a compreensão da biologia molecular fundamental das espécies (BORGOGNONE et al., 2019). Para *P. ostreatoroseus* foi predito 224 tRNAs com comprimento médio de 82 bp. Em comparação com a quantidade de tRNA, as quantidades de rRNA e snRNA foram muito menores, apenas 1 e 19, respectivamente. No entanto, nenhum sRNAs e miRNAs (microRNA) foi previsto (Tabela 5).

Os resultados da anotação de ncRNAs encontrados para *P. ostreatoroseus* são semelhantes na quantidade e no comprimento médio dos tRNAs e snRNAs encontrados para *Pleurotus platypus*. O cogumelo *P. platypus* possui 219 tRNAs e 16 snRNAs e um comprimento médio de 83 e 131 bp, respectivamente. É possível observar que houve uma diferença significativa na quantidade de rRNA entre as duas espécies, *P. platypus* possui 44 rRNA (LI et al., 2018).

Tabela 5: Estatística de ncRNA no genoma de *P. ostreatoroseus*.

<b>Tipo</b>	<b>Número</b>	<b>Comprimento médio (bp)</b>	<b>Comprimento total (bp)</b>
<b>tRNA</b>	224	82	18.591
<b>rRNA</b>	1	3.210	3.210
<b>snRNA</b>	19	126	2.396

Em *Morchella sextelata*, um fungo comestível, os resultados mostraram que haviam 445 tRNAs com comprimento médio de 85 bp (HAN et al., 2019). Em comparação com a quantidade de tRNA, as quantidades de rRNA e snRNA foram muito menores, apenas 55 e 30, respectivamente. No entanto, nenhum sRNAs ou miRNAs foi previsto. No cogumelo *Auricularia heimuer* foram preditos 150 tRNAs, 34 snRNAs, e 11 rRNAs (YUAN et al., 2019).

As análises das sequências dos elementos repetitivos foram realizadas usando o *software* RepeatMasker v4.0.7 e o RepeatModeler v1.0.11. A caracterização dos elementos repetitivos usando os métodos de sequenciamento de nova geração não depende de uma elevada cobertura do genoma (YU et al., 2011).

O comprimento total das sequências repetidas foi de cerca de 1.802.067 bp representando 4.65% do tamanho do genoma. Dos elementos de repetição, os elementos transponíveis e as sequências de repetição em tandem representam 0.0356% e, 0.7752% respectivamente. Já o genoma do cogumelo *Russula griseocarnosa* possui 64.81 Mbp e 33.272 bp sequências repetidas, cobrindo 5% do comprimento genômico (YU et al., 2019).

Por meio dos elementos de transposição (TE) é possível estimar o número de cópias, as bases mascaradas e organização geral no genoma de *P. ostreatoroseus*. Os TEs são sequências de DNA que têm a capacidade de mudar de posição no genoma, independente de homologies entre as regiões. De acordo com o tipo de transposição, RNA ou DNA, os TEs podem ser divididos em duas classes principais com base no intermediário de transposição

(ou seja, classe I ou retrotransposons – intermediário de RNA e classe II ou transposons de DNA – intermediário de DNA) (WICKER et al., 2007).

Entre as sequências analisadas um total de 1.531 bases foram mascaradas, o que correspondeu a 0.77% do genoma. Os TEs da classe I, os retrotransposons LTRs, LINE/L1 e SINE, foram os mais abundantes correspondendo a 0.6977% do genoma e em seguida os da classe II, os transposons DNA, representando 0.0771% do genoma (Tabela 6). Um total de 18 dos TEs identificados não tiveram a classe determinada.

Como já observado em genomas de cogumelos, os elementos LTR retrotransposons constituem a ordem mais frequente. Esses dados corroboram com os mesmos encontrados para as outras espécies de *Pleurotus*. Os TEs de *P. pulmonarius* tinham principalmente elementos de classe I, retrotransposons responsáveis por aproximadamente 80% da fração do genoma repetitivo (ULZURRUN et al., 2020). Para *P. eryngii* as LTRs foram o tipo principal de TEs encontrado (DAI et al., 2019). Li et al., (2018) analisaram o genoma de 90 cogumelos e observaram que os retrotransposons LTRs foram os mais frequentes, seguido dos transposons DNA.

Elementos transponíveis desempenham um papel importante na evolução do genoma, causando rearranjos cromossômicos ou remodelando as redes regulatórias (FESCHOTTE, 2008). Muitos genomas mostram um alto conteúdo de TE, levando a tamanhos de genoma comparativamente maiores. Um efeito da presença de TEs em cogumelos pode estar associado com a repressão transcricional, particularmente quando os genes estão rodeados por TEs. Em um estudo genômico comparativo de duas cepas de cogumelos, *Pleurotus ostreatus* PC15 e PC9, os genes cercados por transposons em uma cepa mostraram forte repressão transcricional, enquanto seus ortólogos na outra cepa eram normalmente expressos (CASTANERA et al., 2016).



Tabela 6: Anotação do total de TEs de *P. ostreatoroseus*.

<b>Tipo</b>	<b>Número</b>	<b>Comprimento total (bp)</b>	<b>Genoma(%)</b>	<b>Comprimento médio (bp)</b>
<b>LTR</b>	985	243.749	0.6317	252
<b>DNA</b>	257	29.756	0.0771	118
<b>LINE</b>	234	24.583	0.0637	110
<b>SINE</b>	14	902	0.0023	64
<b>Desconhecido</b>	18	2.272	0.0059	126
<b>Total</b>	1.531	299.141	0.7752	202

A repetição em tandem (TR) contém duas ou mais unidades de repetição vizinhas. A unidade de repetição varia de 1 pb a 500 pb de comprimento e mostra a diversidade de espécies, permitindo pesquisas de evolução. Os minissatélites, também chamado de repetições em tandem com número variável, é um tipo de sequência curta com unidade de repetição de 15 a 65 pb. A unidade de repetição de variância e a frequência em diferentes espécies tornam o TR disponível para uso como marcador molecular (BARBOSA, 2010).

As repetições de sequência simples (SSR), também chamadas de microssatélites, consistem em motivos de sequências curtas de DNA repetidas (cerca de 2-10 pb de comprimento) em tandem SSRs e derivam da adição ou deleção de unidades repetidas durante a replicação, reparo ou recombinação do DNA após o pareamento incorreto. São encontrados nas regiões codificantes e não codificantes dos genes, e têm estado envolvidos na regulação gênica, variação fenotípica e evolução (LABBÉ et al., 2011).

A análise de regiões microssatélites no genoma é importante para explicar o mecanismo de algumas propriedades fisiológicas e é útil para a pesquisa genômica funcional. Um total de 3.218 TRs com tamanhos de repetição de 1-1.376 bp, 2.443 DNAs de

minissatélites com tamanhos de repetição de 10-60 bp e 291 DNAs de microsatélites com tamanhos de repetição de 2-6 bp foram previstos (Tabela 7).

Tabela 7: Estatística das repetições em *tandem*.

Amostra	Tipo	Número	Tamanho da Repetição	Comprimento total(bp)	No Genoma(%)
	TR	3.218	1-1.376	194.449	0.5039
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	DNA Minissatélite	2.443	10-60	116.157	0.3010
	DNA Microsatélite	291	2-6	13.740	0.0356

Em *Morchella sextelata* (HAN et al., 2019) foi encontrado um total de 15.485 TRs com tamanhos de repetição de 1-1.894 bp, 10.026 minissatélites com tamanhos de repetição de 10-60 bp e 2.702 microsatélites com tamanhos de repetição de 2-6 bp.

Em *P. ostreatus* foram identificados 2.114 SSRs e a frequência média de SSRs no genoma foi de aproximadamente 62 SSRs/Mbp (mega pares de bases) e o comprimento médio foi de 1025 bp/Mbp, representando 0,1% do genoma (QU et al., 2016). As densidades SSR de outros fungos variam de dezenas a centenas de SSRs/Mbp (LABBÉ et al., 2011).

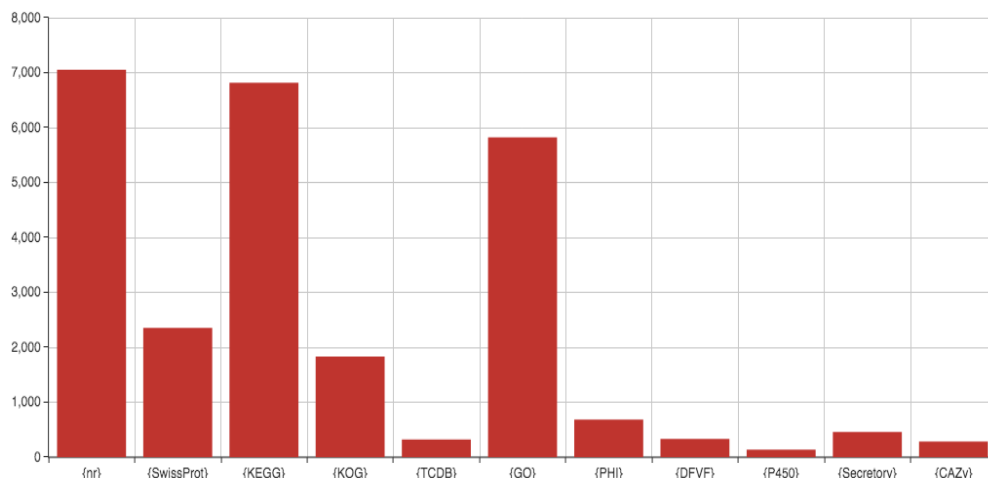
Os microsatélites podem afetar a expressão gênica, *splicing* de mRNA e outras atividades de transcrição por meio da inserção em íntrons e regiões não codificantes (LI et al., 2004). O sequenciamento de nova geração é uma ferramenta poderosa para encontrar um grande número de loci microsatélites por meio de uma identificação rápida e econômica. Esses marcadores podem ser usados para melhoramento genético, determinação de cultivares, pesquisa de estrutura genética e outras aplicações em tipos cultivados e selvagens de cogumelos (AN et al., 2019).

#### 4.2.3 Predição Funcional Genômica

As anotações funcionais dos genes previstos pelos bancos de dados públicos foram mostradas na Figura 7, onde os valores representam o número de genes codificadores anotados no banco de dados correspondente. Os genes que codificam proteínas na sequência

genômica foram previstos com base na homologia da sequência. Dos 11.296 genes identificados, o maior número de genes anotado foi para a bases de dados NR (7000).

Figura 7: Resultados estatísticos da anotação de genes.

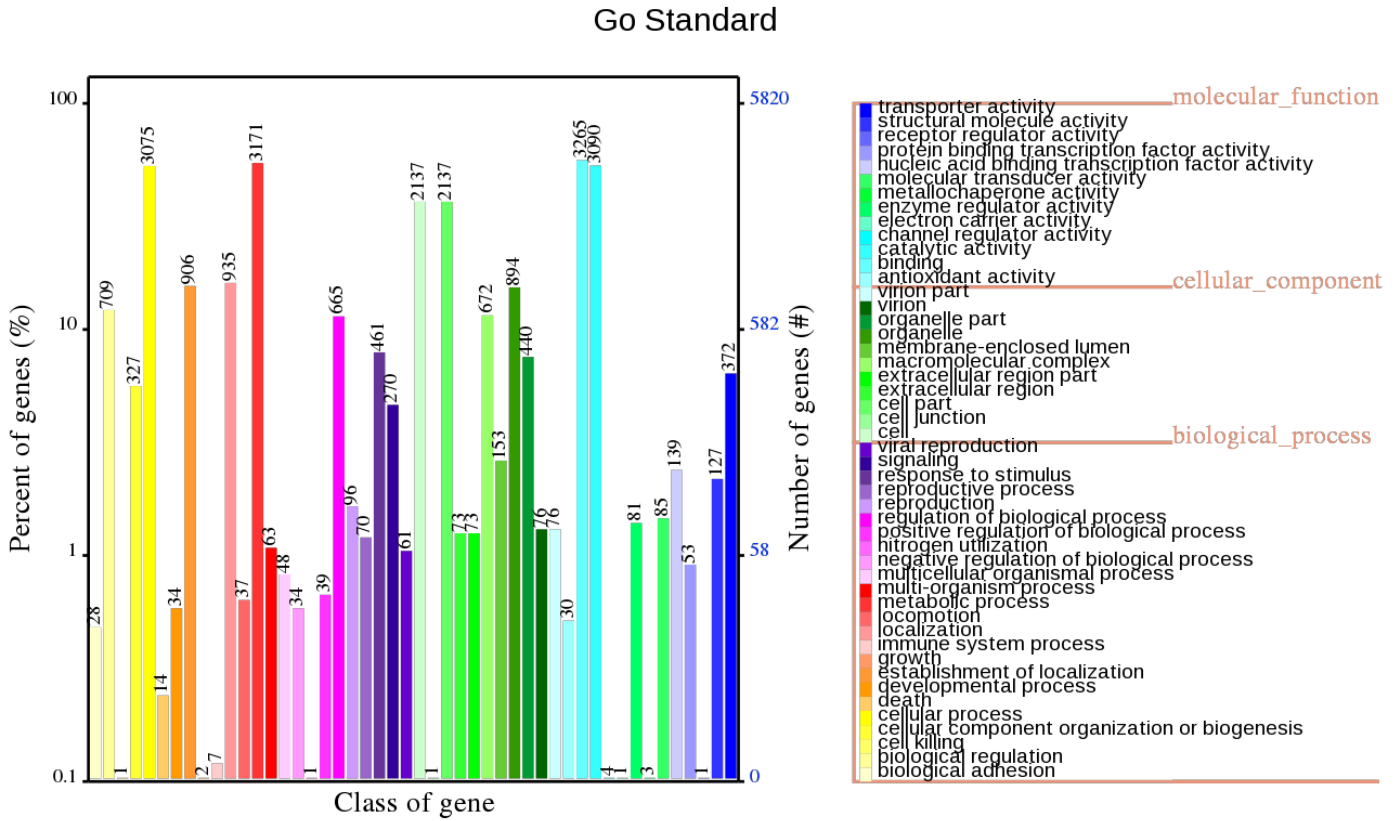


#### 4.2.3.1 Gene Ontology (GO)

O Gene Ontology é o padrão estabelecido para a anotação funcional de produtos gênicos. A ontologia cobre três domínios: componente celular, as partes de uma célula ou seu ambiente extracelular; função molecular, as atividades elementares de um produto gênico no nível molecular, como ligação ou catálise; e processos biológicos, operações ou conjuntos de eventos moleculares com início e fim definidos, pertinentes ao funcionamento de unidades vivas integradas: células, tecidos, órgãos e organismos (The Gene Ontology Consortium, 2015).

Os genes foram classificados em uma ou várias partes do GO por suas funções. Baseando-se nos resultados da anotação GO, foi possível detectar as funções genéticas. As estatísticas da anotação GO foram listadas na figura 8.

Figura 8: Anotação da função GO de *P. ostreatoroseus*



Na anotação do GO foram anotados 5820 genes e os mais abundantes estão envolvidos nas três categorias de anotação: 11.017 estão envolvidos nos processos biológicos, 7.251 genes nas funções moleculares e 6.732 genes participam dos componentes celulares.

Na categoria processos biológicos, 3.171 genes estão ligados a processos metabólicos e 3.075 a genes associados a processos celulares. Isso ocorre, porque os processos metabólicos são um conjunto amplo de procedimentos responsáveis pela síntese e degradação de moléculas das células e as vias metabólicas dessa síntese ou degradação ocorrem constantemente para suprir o funcionamento da célula. Os processos celulares são

abundantes uma vez que fazem referência as atividades celulares de crescimento, manutenção e comunicação entre células (JUNG et al., 2014).

Na categoria função molecular, 3.265 genes estão associados à atividade de ligantes não definidas, 3.090 genes associados a atividades catalíticas. A razão por essas sequências estarem amplamente relacionadas a ligações é referente a importância das mesmas em formar ligações ocorrentes entre moléculas como proteína-proteína, proteína-DNA, cofator-enzima, entre outras, sendo essas ligações fundamentais para o controle e funcionamento das moléculas envolvidas no metabolismo celular. Sequências relacionadas à atividade catalítica estão em abundância, pois grande parte das reações químicas ocorre com a presença de enzimas, moléculas capazes de aumentar a velocidade das reações químicas sem serem consumidas no processo (NELSON; COX, 2018).

Considerando a anotação GO para componente celular, pode-se verificar que a maior parte dos transcritos foram anotados como pertencentes às categorias ontológicas relacionadas com a estrutura da célula (2.137 genes) e com organelas (849 genes). As sequências ligadas a função celular ou parte celular são correspondentes a genes que exercem sua função no citoplasma e não estão agregados na membrana plasmática ou em organelas (CARBON et al., 2009). É esperado que 50% dos genes atuem no citoplasma, pois é nesse local da célula onde acontece a grande maioria dos processos metabólicos. As sequências correspondentes a organelas estão associadas aos elementos constitutivos da célula ou aos que atuam no núcleo, mitocôndria, vesículas e ribossomos. Essas sequências estão entre as mais abundantes pois é nas organelas que ocorrem processos metabólicos fundamentais para o funcionamento da célula como a respiração, estruturação celular e síntese de biomoléculas (NELSON; COX, 2018).

Qu et al., (2016) observaram que na categoria função molecular de *P. ostreatus*, a atividade catalítica e a de ligação foram as subcategorias que tiveram um maior número de genes envolvidos. No processo biológico, o processo metabólico e processo celular, foram os dois principais termos de GO. E no processo celular, a atividade catalítica seguida de ligação foram as subcategorias que se destacaram.

Yuan et al., (2019) analisaram o genoma do cogumelo *Auricularia heimuer*, onde a função molecular possui 4.119 genes associados à atividade de ligantes não definidas e

3.482 genes associados a atividades catalíticas; seguida por processo biológico, 3.171 genes ligados a processos metabólicos e 3.075 genes associados a processos celulares e por fim componentes celulares, 1.054 genes envolvidos nas partes celulares e 1.054 funções celulares não definidas.

Na análise comparativa do GO do cogumelo *Russula griseocarnosa* (YU et al., 2019), foram anotados 3650 genes. Na categoria função molecular, 1715 e 1398 dos genes estavam envolvidos na atividade catalítica e de ligação, respectivamente. Nos processos biológicos, 1.673 genes estavam envolvidos em atividades metabólicas, seguidos por 1635 genes em funções celulares. Para processos celulares, 1397 e 1389 genes foram associados a célula e partes de células, respectivamente. Nesse estudo, os autores compararam as anotações GO de *R. griseocarnosa* com outros dois fungos, *Agaricus bisporus* e *Laccaria bicolor*. *R. griseocarnosa* tem relativamente mais genes em subcategorias de processo biológico e componentes celulares como: processo de organismo único, resposta ao estímulo, organização do componente celular, regulação negativa do processo biológico, regulação positiva de processo biológico, parte de organela, membrana e parte de membrana. Eles observaram que os números de genes da categoria processos biológicos de *R. griseocarnosa* eram semelhantes às de *Agaricus bisporus* e em menor número do que os de *Laccaria bicolor*, sugerindo que *R. griseocarnosa* tem capacidade significativa de crescimento e de responder a ambientes diferentes.

Para o cogumelo medicinal, *Hericium erinaceus* (GONG et al., 2020), 5.187 genes foram anotados pela análise de GO, e as quatro principais categorias de GO com o maior número foram ligação, atividade catalítica, processo metabólico e processo celular.

Para o ascomiceto, *Morchella sextelata* (HAN et al., 2019), a análise do GO resultou em um total de 5.876 genes. Vários processos biológicos foram preditos como mediados pelos genes, por exemplo, 3.335 e 3.239 genes possivelmente participam do processo celular e processo metabólico. Na função molecular, 3.381 genes estão associados à atividade de ligantes não definidas, 2.986 genes associados a atividades catalíticas. Para processos celulares, 2.184 genes foram associados à célula, o mesmo número de genes contribuiu para parte da célula, e 1.024 genes para organelas.

As categorias observadas são, em sua maioria, compatíveis com resultados de anotações funcionais de outras espécies de fungos. A categoria função molecular se destaca, com as subcategorias ligantes não definidas e a atividades catalíticas com maior número de genes. Isso ocorre porque ambos são processos importantes para o funcionamento e manutenção dos organismos vivos.

A distribuição de GO permite uma visão geral da expressão gênica de um organismo sob determinada condição. Uma grande parte dos genes está relacionada com as funções moleculares e os processos biológicos, demonstrando a atuação de uma rica diversidade de enzimas na síntese de metabólitos secundários. Wei et al., (2015) afirmam que se o número de genes relacionados a processos celulares e processos metabólicos forem proporcionais, o indicativo é de que o organismo esteja investindo na síntese de metabólitos primários, o que corresponde aos dados encontrados.

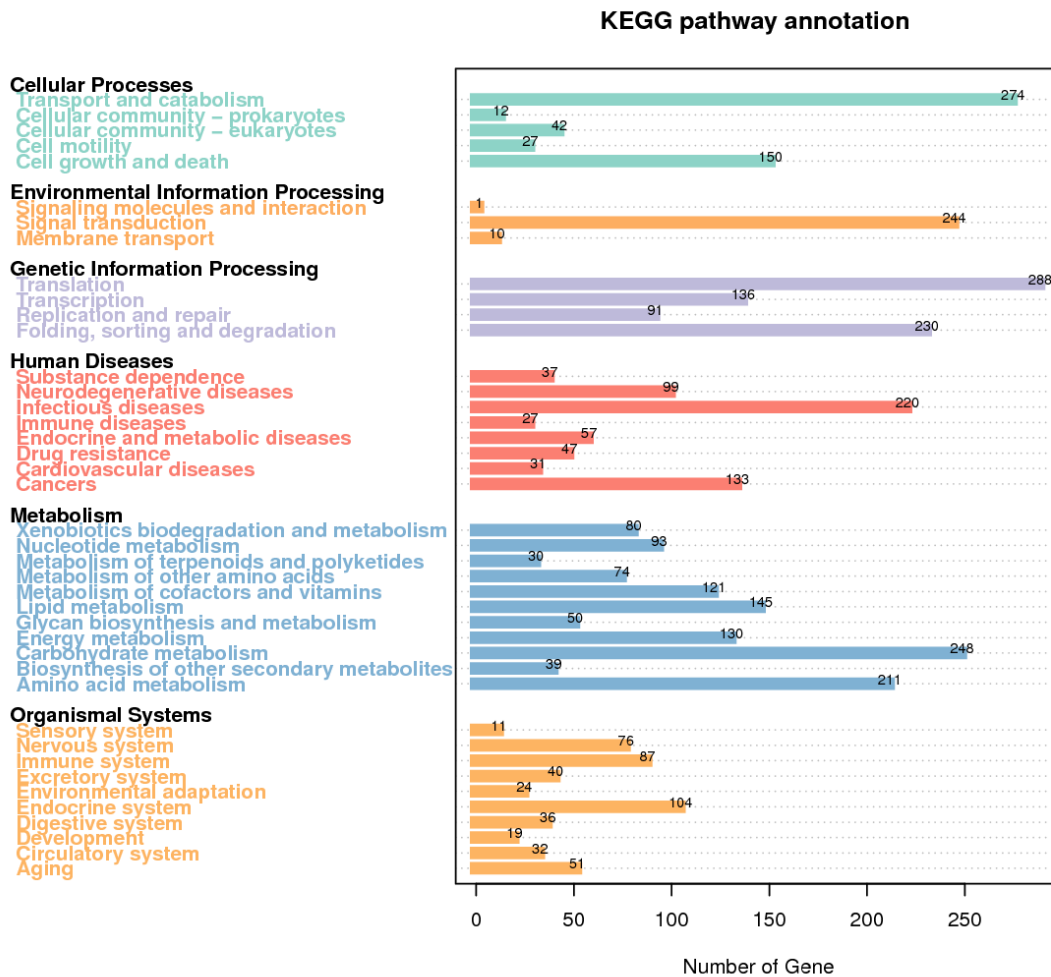
#### 4.2.3.2 KEGG

Para avaliar melhor as funções dos genes anotados em *P. ostreatoroseus*, foi atribuído 3.857 proteínas putativas a seus ortólogos no banco de dados KEGG. A classificação da função KEGG é mostrada na Figura 9. Em termos de processo celular, as

Figura 9: Anotação funcional KEGG de *P. ostreatoroseus*.

classes com maior número de genes anotados foram as de transporte e catabolismo (274) e de crescimento e morte celular (150). Em processamento de informações ambientais, as classes com o maior número de genes anotados foram as de transdução de sinal (244) e transporte de membrana (10). Já em termos de metabolismo, o maior número de genes anotados foi o de metabolismo de carboidratos (248), metabolismo de aminoácidos (211) e metabolismo lipídico (145). De uma forma geral, a classe com maior número de genes anotados foi a do metabolismo, assim como foi observado em outros estudos com cogumelos

como o *Hericium erinaceus* (GONG et al., 2020), onde 2.761 genes foram anotados pela via KEGG, e dos quais a grande parte dos genes estavam envolvidos no metabolismo.



Com relação ao metabolismo de aminoácidos foram encontrados genes associados com os componentes do sabor do cogumelo: 33 genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos relacionados ao sabor doce, como glicina, serina e treonina e 23 genes



envolvidos no sabor umami dos cogumelos, incluindo alanina, aspartato e glutamato. Shim et al., (2016) ao analisarem a função dos genes anotados para o cogumelo *Lentinula edodes* nas classificações KEGG, observaram que haviam 22 genes relacionados ao sabor doce e 17 genes envolvidos no sabor umami desse cogumelo.

A maior concentração de ácidos graxos encontrados nos cogumelos é insaturada. Foi observado que existem 20 genes relacionados a biossíntese de ácidos graxos insaturados em *P. ostreoroseus*. Já em *R. griseocarnosa* (YU et al., 2019) foram relacionados 11 genes a biossíntese de ácido graxos insaturados.

Os polissacarídeos responsáveis pelo potencial farmacêutico são outro tipo de compostos bioativos. Entre os polissacarídeos, o  $\beta$ -1,3-glucano possui compostos imunomoduladores e antitumorais mais ativos (MIZUNO & NISHOTANI, 2013; YAP et al., 2014) e podem estar envolvidos na biossíntese de Lentinan, que é um  $\beta$ -1,3-glucano purificado com ramificações  $\beta$ -1,6 derivados do cogumelo comestível *Lentinula edodes* e tem efeitos adjuvantes imunológicos, que aumentam os mecanismos de defesa do hospedeiro contra tumores (SAKAMOTO et al., 2005; HAZAMA et al., 2009). Foi possível identificar enzimas que podem estar envolvidas na biossíntese de glicose difosfato de uridina (UDP-glicose, precursor de glucanos) em *P. ostreoroseus*. Essas enzimas incluem 1,3-beta-glucano sintase, hexoquinase, fosfoglucomutase, proteína ativadora de GTPase e UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase.

Sob a categoria de via do metabolismo e biodegradação de xenobióticos, *P. ostreoroseus* possui genes envolvidos em várias vias de degradação, incluindo aquelas para benzoato, cloroalcano e cloroalceno, degradação de dioxina, naftaleno e hidrocarboneto aromático policíclico. Esses resultados indicam que esse cogumelo tem forte capacidade de degradação. Wesenberg et al., (2003) observaram que os fungos de podridão branca são hábeis em degradar xenobióticos e corantes no tratamento de efluentes.

Lam et al., (2018) observaram que no genoma de *Pleurotus tuber-regium* possuía 4881 proteínas (44,53%) envolvidas em diferentes vias. Em termos de processo celular, as classes com os maiores números de genes anotados foram as de transporte e catabolismo (295) com o crescimento e morte celular (186). Em termos de processamento de informações ambientais, as classes com maiores números de genes anotados foram a transdução de sinal

(365) e o transporte de membrana (28). Em termos de metabolismo, os maiores números de genes anotados foram para as classes de metabolismo de carboidratos (463), metabolismo de aminoácidos (356) e metabolismo de lipídeos (281).

Para entender melhor as funções dos genes em *A. Heimer*, Yuan et al., 2019, conseguiram atribuir 5676 (34,94%) proteínas putativas aos seus ortólogos no banco de dados KEGG. No processo celular, o transporte e catabolismo (381) com o crescimento e morte celular (288) foram as classes com maiores números de genes. Em termos de processamento de informações ambientais, os maiores números de genes estavam nas classes de transdução de sinal (427) e transporte de membrana (48). No metabolismo, as classes que se destacaram mais foram as de mapas globais e gerais (1483) e transporte e catabolismo (519).

A anotação do banco de dados da via KEGG permite a expansão da compreensão das funções biológicas e interações dos genes. Com o intuito de compreender melhor essa interação, Yu et al., 2019 descreveram que dos genes anotados para *R. griseocarnosa*, 4169 genes tinham correspondências no banco de dados KEGG. Dos seis níveis principais, o metabolismo foi o maior (1775), seguido pela informação genética (1008), doenças humanas (756), processos celulares (756), sistemas orgânicos (633) e processamento de informações ambientais (411). Assim, é notório que há genes correspondentes a processos metabólicos significativos. Nesse mesmo estudo, os autores fizeram uma comparação com as anotações KEGG de *L. bicolor* e *A. bisporus*, e o número de genes de *R. griseocarnosa* associados à maioria das vias não foi significativamente diferente do número de genes para *L. bicolor* e *A. bisporus*, mas havia menos genes *R. griseocarnosa* nas vias do metabolismo de aminoácidos. Na categoria de via metabolismo e biodegradação xenobióticos, foi eles observaram que *R. griseocarnosa* tinha relativamente mais genes envolvidos em várias vias de degradação do que os outros cogumelos analisados, indicando que possui capacidade de degradação.

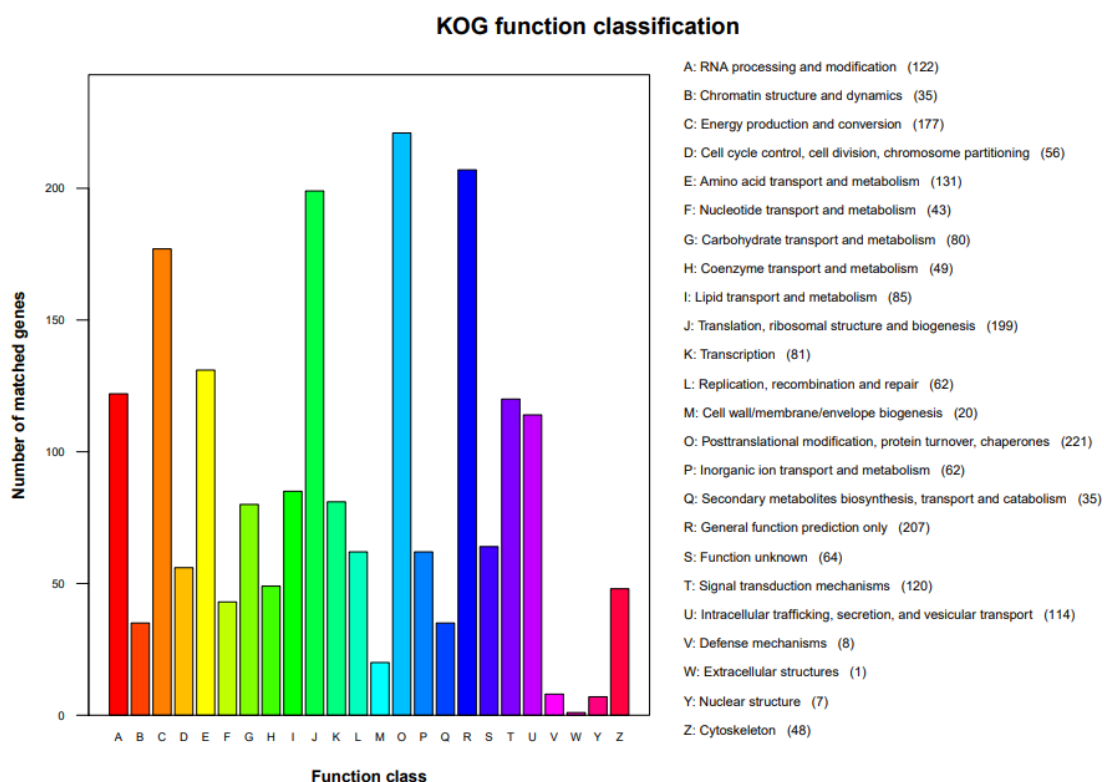
Xie et al., 2018 anotaram os genes do cogumelo *Pleurotus eryngii* e atribuíram as sequências em classificações KEGG. Uma quantidade total de 8.854 genes foi dividida nos grupos funcionais. As principais vias de KEGG foram a de metabolismo do carbono, biossíntese de aminoácidos e fosforilação oxidativa.

#### 4.2.3.3 KOG

KOG é um recurso de banco de dados de grupos ortólogos de proteínas para eucariotos. Pertence ao COG (cluster de grupos ortólogos de proteínas).

Foram atribuídas às categorias KOG 2.027 proteínas (Figura 10). A classe modificação pós-traducional, turnover proteico e chaperonas teve o maior número de genes (221), seguido por predição funcional geral (207), tradução, estrutura ribossomal e biogênese (199), produção e conversão de energia (177), como as classes mais ricas em genes nos agrupamentos KOG.

Figura 10: Anotação KOG de *P. ostreatoroseus*



Resultados semelhantes foram encontrados para o cogumelo *Auricularia heimuer*, em que as classes: predição funcional geral (408); tradução, estrutura ribossomal e biogênese (223), modificação pós-traducional, turnover proteico, chaperonas (197),

transcrição (184), replicação, recombinação e reparo (180) e produção e conversão de energia (168) como as classes mais ricas em genes nos agrupamentos KOG. Esses achados podem ser sugestivos da presença de um conjunto enriquecido e variado de funções do metabolismo de proteínas e do metabolismo de energia que permitem melhor absorção e transformação de nutrientes dos substratos.

Para *R. griseocarnosa* (YU et al., 2019), 10.318 proteínas foram atribuídos as categorias KOG. As classificações de KOG com maior número de genes foram: replicação, recombinação e reparo, modificação pós-traducional, turnover proteico, chaperonas, transporte intracelular, secreção e transporte vesicular e mecanismos de transdução de sinal. Nesse mesmo estudo, os autores fizeram uma comparação também com as anotações KOG de *L. bicolor* e *A. bisporus*, e observaram que *R. griseocarnosa* possuíam relativamente mais genes em replicação, recombinação e reparo e em compensação não tinha genes em estruturas extracelulares. Esses achados sugerem a presença de uma rica e variada matriz de processos celulares e mecanismos de sinalização e metabolismo que pode facilitar a absorção nutricional de *R. griseocarnosa*.

Han et al., (2019) classificaram 2.148 proteínas com base no banco de dados funcional KOG para *Morchella sextelata*. A maioria dos genes anotados foram previsto para função geral (331). E as outras principais categorias que se destacaram seguem a seguir: modificação pós-tradução, turnover proteico, chaperonas (240 genes); tradução, estrutura ribossomal e biogênese (219 genes) transporte e metabolismo de aminoácidos (161 genes).

Para *P. tuber-regium* (LAN et al., 2018) 3.381 proteínas foram atribuídas a diferentes classes. Em termos de classes KOG, exceto para predição de função geral (560), as três classes com maior destaque em ordem decrescente foram: modificação pós-tradução, turnover proteico, chaperonas (365); tradução, estrutura ribossomal e biogênese (252) e mecanismo de transdução de sinal (238).

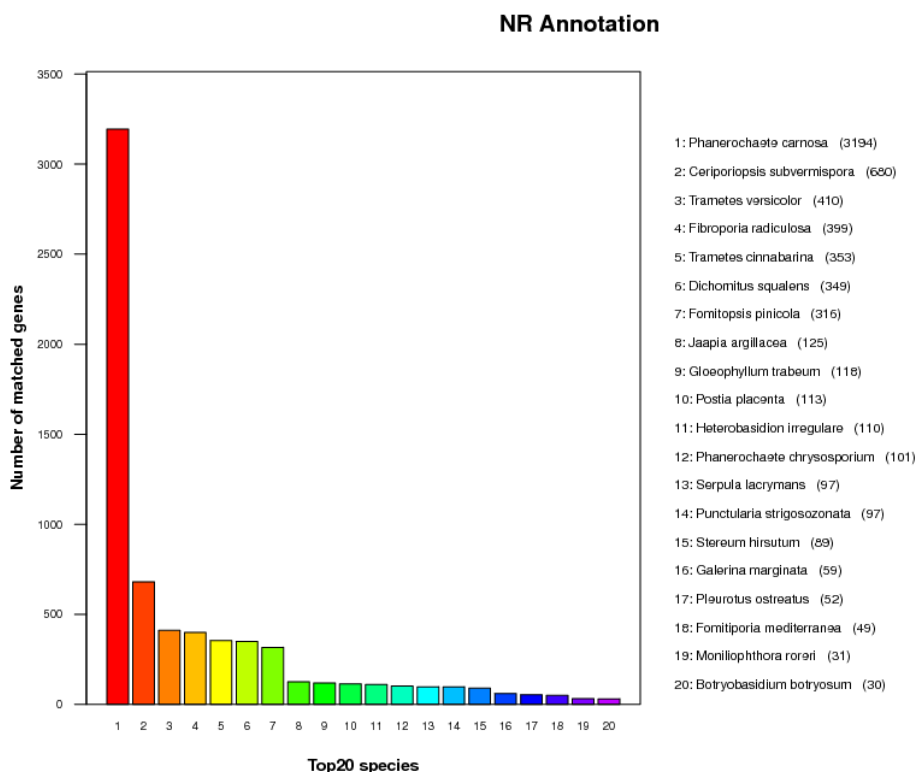
Yap et al., (2014) atribuíram 4.948 proteínas a classes KOG do cogumelo *Lignosus rhinocerotis*. A categoria predição funcional geral (predição típica da atividade bioquímica), que possui o maior número de genes (1.785), indica que essas proteínas não foram atribuídas a um determinado grupo. Seguido por transporte e metabolismo de carboidratos; transcrição; replicação, recombinação e reparo; tradução, estrutura ribossomal

e biogênese como as cinco categorias de genes mais abundantes no agrupamento KOG. Esses achados sugerem a presença de uma gama enriquecida e variada de mecanismos de absorção e metabolismo de carboidratos de *L. rhinocerotis* porque tal estilo de vida resulta na exposição a formas e fontes de carboidratos mais diversas, em oposição aos saprófitos da madeira.

#### 4.2.3.4 NR

O NR (sequências de proteínas não redundantes de NCBI) é o banco de dados de sequência de proteínas formais do NCBI, que incluem informações de sequência de proteínas do GenBank, PDB (*Protein Data Bank*), Swiss-Prot, PIR (*Protein Information Resource*), PRF (*Protein Research Foundation*), etc. Seu sistema de informação abrangente em nível de espécie e pode ser usado para classificação de espécies.

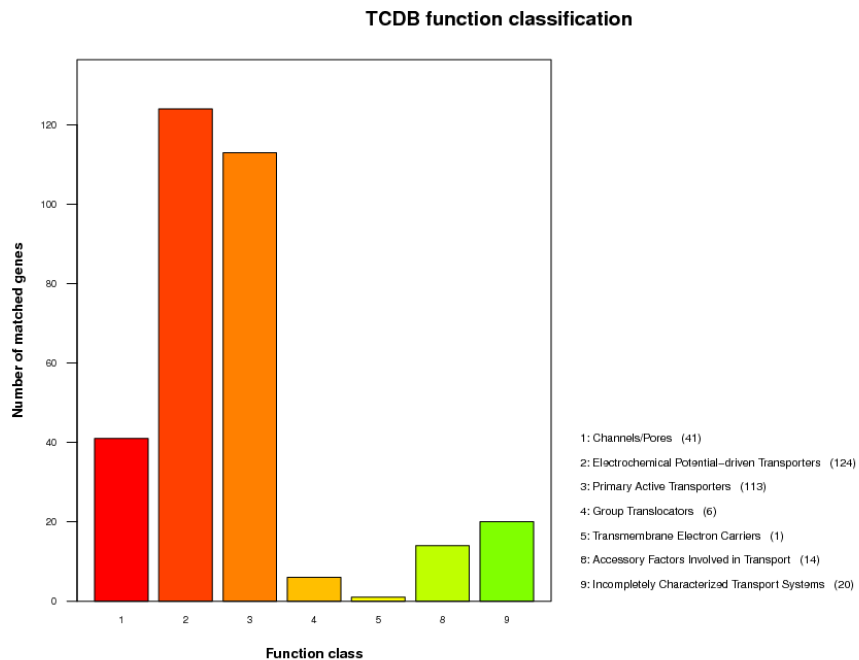
Figura 11: Estatística das espécies e genes anotados.



Na anotação NR (Figura 11) foi realizada a comparação proteica com vinte espécies fúngicas depositadas nos bancos de dados NCBI, onde constatou-se a similaridade de 3.194 genes de *P. ostreatoroseus* com a espécie fúngica *Phanerochaete carnosae*. Essa similaridade proteica pode ser devido ao fato de que a espécie *P. carnosae* é um basidiomiceto, conhecido como fungo de podridão branca. São denominados dessa forma por colonizarem a madeira em decomposição e realizarem a biodegradação da lignina, expondo assim as fibras de celulose. Essa mesma característica é encontrada nas espécies pertencentes ao gênero *Pleurotus* que também possuem um complexo enzimático lignocelulotítico único, que os habilita a decomporem substratos indisponíveis para a grande maioria dos organismos. É possível que esses genes sejam conservados nas espécies desses fungos.

#### 4.2.3.5 TCDB

Na anotação TCDB que indica a classificação funcional e filogenética de proteínas de transporte de membranas, foram observados 124 genes de transportadores acionados por potencial eletroquímico, esses genes representam uma vasta gama de proteínas com



especificidades variadas de substrato; 113 genes para transporte ativo primário e 41 para canais/poros (Figura 12).

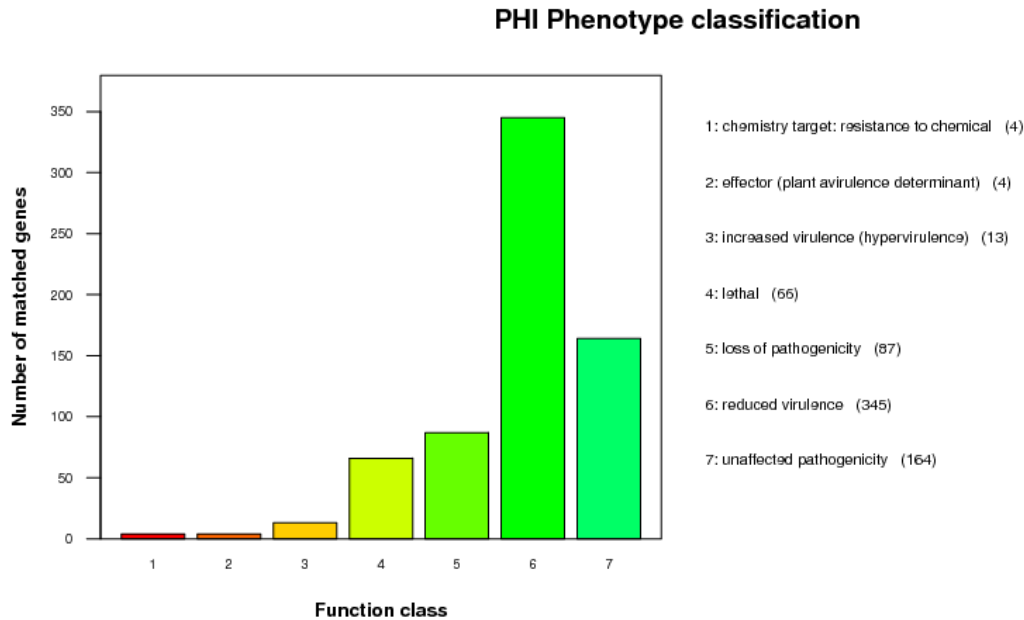
Figura 12: TCDB classificação das proteínas de transporte em *P. ostreatoroseus*.

Para o fungo *M. sextelata*, a maioria das proteínas transportadoras foram enriquecidas em transportadores ativos primários (120), 111 proteínas foram anotadas como transportadores acionados por potencial eletroquímico e 55 em canais e poros (Han et al., 2019).

#### 4.2.3.6 PHI

Para identificar potenciais genes codificadores de proteínas relacionados à patogenicidade e virulência no genoma de *P. ostreatoroseus*, pesquisas no banco de dados de interação patógeno-hospedeiro (PHI) e no banco de dados de fatores de virulência fúngica (DFVF) foram realizadas. No PHI foram previstos 683 genes e no DFVF 287 genes. Além disso, 231 genes foram identificados em ambos bancos de dados. Dos genes PHI, a virulência reduzida (345) foi a mais abundante, seguida por patogenicidade não afetada (164), perda de patogenicidade (87), letal (66), virulência aumentada (13), alvo químico (4) e efetores (4) (Figura 13).

Figura 13: Classificação fenotípica PHI em *P. ostreatoroseus*.



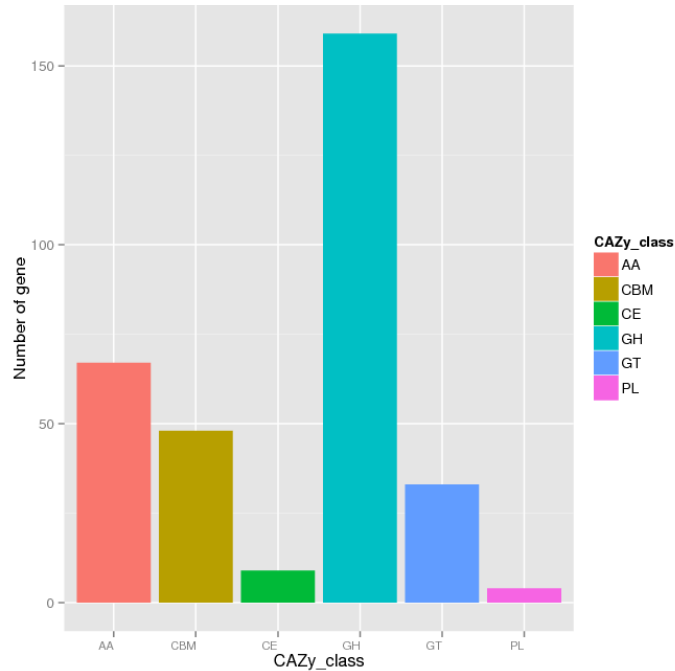
Até o momento, existe apenas um artigo publicado sobre o número de genes preditos para PHI em cogumelos. Yuan et al., (2019) anotaram o genoma de *Auricularia heimuer*, e previram 585 genes para o banco de dados PHI.

#### 4.2.3.7 CAZy (Carboidrate Active enzymes)

As proteínas preditas em *P. ostreatoroseus* foram classificadas em famílias CAZy, que são enzimas relacionadas com a degradação e biosíntese de carboidratos. Noventa e uma famílias de genes de CAZyme foram identificadas em um total de 320 genes homólogos. Esses genes incluem 159 hidrolases de glicosídeos (GHs), 67 atividades auxiliares (AAs), 9 esterases de carboidratos (CEs), 4 polissacarídeos liases (PLs), 33 glicosil transferases (GTs) e 48 módulos de ligação a carboidratos (CBMs) (Figura 14).

Figura 14: Gráfico de colunas indicando a distribuição dos domínios CAZy. CBM: módulo de ligação a carboidratos; CE: esterase de carboidratos; GH: glicosídeo hidrolase; GT: glicosil transferase; AA: atividade auxiliar e PL: polissacarídeo liase.





As GTs são proteínas envolvidas na síntese de biomassa, enquanto AAs, CEs, GHs e Pls são proteínas envolvidas na degradação da biomassa. CMBs são proteínas que atuam na ligação de carboidratos e sua aproximação aos sítios ativos de enzimas catabólicas ou anabólicas (LAM et al., 2018). Os GHs hidrolisam principalmente a ligação glicosídica entre carboidratos ou entre um carboidrato e um não carboidrato (SATHYA & KLAN, 2014). As CEs são enzimas que catalisam a desacilação de ésteres ou amidas nas quais os açúcares desempenham o papel de álcool e amina (BIELY, 2012).

As famílias GH 16 (22 genes), GH 3 (11 genes), GH 61 (14 genes), GH 18 (10 genes) e GH 5 (17 genes) foram dominantes entre os GHs anotados para *P. ostreatoroseus*. Xie et al., (2018) obtiveram essas mesmas famílias de GHs como predominantes na análise das CAZymes para *P. eryngii*: GH 16 (16 genes), GH 3 (12 genes), GH 61 (17 genes), GH 18 (11 genes) e GH 5 (20 genes). As enzimas da família GH 16 possuem atividade de xiloglucanase e podem degradar  $\beta$ -1,3-glucanos ou xiloglucanos (NAKAJIMA et al., 2012). As enzimas da família GH 3 clivam as  $\beta$ -hexosaminidas que

retêm as fosforilases de  $\beta$ -glicosídeos (MACDONALD et al., 2015). As enzimas da família GH 61 são monooxigenases polissacarídicas líticas (LANGSTON et al., 2011). GH 18 pode degradar a quitina e clivar a ligação  $\beta$ -1,4 entre a N-acetilglucosamina (TZELEPIS et al., 2015). GH 5 é uma das maiores famílias de GH e consiste em uma ampla gama de atividade de enzimas em diferentes substratos, como  $\beta$ -1,3-glucanos,  $\beta$ -1,4-glucanos na celulose e  $\beta$ -1,4-mananos na hemiceluloses (ASPEBORG et al., 2012).

Na distribuição de genes lignocelulolíticos em *P. ostreatoroseus* foram identificadas as famílias para a degradação: 1) celulase: GH 5, GH7, GH12, GH 44, GH 45, AA 9, GH 6, GH 7, GH1 e GH 3; 2) hemicelulase: GH 10, GH 3, GH43, GH 51 e CE 1; 3) pectinase: CE 8 e GH 28; 4) lignina: AA 1 e AA 2 e 5) enzimas auxiliares de degradação da lignina: AA 3, AA5 e AA 6. Esse cogumelo pode degradar todos os componentes da parede celular da planta e tem uma eficiência de degradação de lignina particularmente alta.

Em *P. ostreatoroseus* o número de GHs foi significativamente maior do que os GTs. Para a maioria dos trabalhos realizados com fungos é possível encontrar essa mesma diferença. Por exemplo, para *A. heimuer* (YUAN et al., 2019) os autores associaram que essa diferença significativa pode estar ligada ao estilo de vida do fungo, no qual sua sobrevivência depende da decomposição da lignocelulose. Eles concluíram que a decomposição dos polissacarídeos é mais importante do que sua construção para o crescimento e metabolismo de *A. heimuer*.

Uma característica predominante nos fungos da podridão branca são as enzimas AA 5 e AA 2, que compreendem as enzimas oxidativas e as peroxidases, respectivamente, e foi possível identificá-las no genoma de *P. ostreatoroseus* (AA5: 9 genes; AA2: 13 genes). As enzimas de degradação de hemicelulose (GH 10 e GH 115) e de degradação da pectina (GH 43, GH 51, GH 78 e PL 4) foram constatadas nessa análise realizada. Foi encontrada também a família de módulo de ligação a carboidratos CBM 1 (27 genes), que tem a função de ligação à celulose, sugerindo que esses genes podem desempenhar um papel mais importante na degradação da celulose.

A anotação do genoma de *P. ostreatoroseus* revelou genes que codificam as enzimas lignocelulolíticas. Os resultados mostram um perfil metabólico do cogumelo analisado neste trabalho, exibindo uma vasta produção de enzimas das classes hidrolases,

transferases e oxidorreduções. Essas enzimas são associadas à degradação da lignina de substratos lignocelulósicos.

Lam et al., (2018) observaram que o genoma de *P. tuber-regium* é composto por 130 AAs, 143 CBMs, 25 CEs, 162 GHs, 50 GTs e 14 PLs. Nessa pesquisa eles escolheram sete outros cogumelos comestíveis/medicinais, de diferentes gêneros para uma comparação com *P. tuber-regium* com base em seu sistema CAZyme. Incluíram três espécies de *Pleurotus* mais comumente consumidos que são *P. eryngii*, *P. ostreatus*, e *P. salmoneostramineus*. E quatro outros cogumelos comestíveis/medicinais que não pertencem ao gênero *Pleurotus*, como *Lignosus rhinocerotis*, *Grifola frondosa*, *Wolfiporia cocos* e *Ophiocordyceps sinensis* foram escolhidos para comparação. Entre as quatro espécies de *Pleurotus*, *P. salmoneostramineus* (841) foi a que teve o maior número total de CAZymes, portanto os autores esperam que esse cogumelo tenha maior eficiência na conversão de biomassa. Todos os quatro cogumelos *Pleurotus* tiveram um total de variedade de CAZymes em torno de 110-130, o que implica que eles podem com eficiência metabolizar qualquer composto feito de diferentes fontes lignocelulósicas ou biomassa lignocelulósica na natureza. Na comparação de *P. tuber-regium* com os outros quatro cogumelos, *P. tuber-regium* teve o maior número total de CAZymes (524), e entre os três, *W. cocos* parece ser o mais eficiente na conversão de biomassa. A variedade total de CAZymes foi de cerca de 100-120, para esses últimos cogumelos analisados.

A sequência do genoma de *R. griseocarnosa*, um basidiomiceto formador de ectomicorrizas, foi analisada por Yu et al., (2019) para determinar a presença de enzimas ativas por carboidratos (CAZymes). A análise revelou 353 genes que codificam CAZymes, que foram distribuídos entre 91 famílias de proteínas CAZymes. Isso inclui 133 GHs, 80 AA, 78 GTs, 45 CEs, 12 CBMs e 5 PLs. A análise da base de dados CAZy sugeriu que esse fungo simbiótico codifica um rico conjunto de CAZymes em números e distribuição semelhantes aos dos fungos simbióticos *L. bicolor* e *S. citrinum*, mas parece codificar relativamente poucas enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos da parede celular de plantas. *R. griseocarnosa* teve mais GTs e CEs, e menos GHs e CBMs comparadas as outras espécies de fungos. Os CAZymes de *R. griseocarnosa* confirmam a adaptação do repertório de enzimas dessa espécie fúngica para simbiose, e revela a estratégia para a interação com o

hospedeiro. O número reduzido de CAZymes para a degradação do polissacarídeo da parede celular de plantas é óbvio para quase todas as famílias de glicosídeos hidrolases, com a ausência completa das famílias GH 6 e GH 7, consistente com os genomas de *L. bicolor* e *S. citrinum*. As enzimas degradantes de hemicelulose (GH 10, GH 11 e GH 115) e enzimas degradantes de pectina (GH 43, GH 51, GH 78, GH 93, PL 1, PL 3 e PL 4) também estavam ausentes dos genomas de *R. griseocarnosa*, *L. bicolor* e *S. citrinum*. Essas observações sugerem uma perda de enzimas degradantes da parede celular da planta em *R. griseocarnosa* devido à sua adaptação a um estilo de vida simbiótico. Essa espécie agora é incapaz de utilizar muitos polissacarídeos da parede celular de plantas como fontes de carbono, incluindo aqueles encontrados no solo e serapilheira. Os autores ainda sugerem que *R. griseocarnosa* parece ter desenvolvido a capacidade de degradar polissacarídeos não vegetais (por exemplo, polissacarídeos animais e bacterianos), dada a presença de CAZymes nas famílias GH 79, GH 88, PL 8 e PL 14. Esses achados são semelhantes aos resultados de estudos anteriores sobre CAZymes nas espécies de fungos simbióticos *L. bicolor* e *S. citrinum*.

No cogumelo comestível e medicinal *H. erinaceus* (GONG et al., 2020) foram identificados um total de 341 genes candidatos a CAZymes, que incluiu 161 GHs, 59 GTs, 7 PLs, 26 CEs, 4 CBMs e 84 AAs. O amplo espectro de famílias de GHs necessárias para digerir a celulose (por exemplo, GH 5, GH 6 e GH 7) e hemicelulose (por exemplo, GH 3, GH 10 e GH 43) foram encontradas no genoma de *H. erinaceus*. Além disso, como em outros fungos da podridão branca, como *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus*, *H. erinaceus* possui famílias de genes necessários para digerir a lignina. Seis genes que codificam peroxidases degradantes de lignina e quinze genes de monooxigenases de polissacarídeo foram observados em *H. erinaceus*. No geral, *H. erinaceus* foi bem equipado para as famílias de genes envolvidos na degradação da parede celular da planta, pois é um fungo de podridão branca. O perfil CAZymes em *H. erinaceus* também foi comparado com os de outros fungos. O número de GHs, PLs, CEs e CBMs de *H. erinaceus* foi comparável ao de *Heterobasidion irregulare* e *Hericiium alpestre*, menos do que em fungos típicos de podridão-branca, como *L. edodes* e *P. ostreatus*, mas maior que os fungos da podridão parda, como *Postia placenta* e *Serpula lacrymans*. Os autores observam que as espécies de

*Hericium* têm um número reduzido de CBMs. Esses resultados podem indicar que *H. erinaceus* tem uma capacidade de degradação lignocelulósica menos proeminente.

No fungo de podridão branca, *L. edodes*, Chen et al., (2016) encontraram um total de 461 genes de enzimas ativas a carboidratos (CAZymes), que incluiu 245 GH, 31 CE, 75 GT, 9 PL, 58 CBM e 85 AA. Além disso, os autores observaram que o genoma de *L. edodes* é particularmente rico em membros das famílias de hidrolase de glicosídeo (GH 13, GH 15, GH 17, GH 27, GH 71) e a família de módulo de ligação a carboidratos CBM20, indicando que tem grande potencial de degradação do amido. Da mesma forma, foram identificados 9 genes que codificam para a hemicelulase e 7 para a pectinase. *L. edodes* pode degradar todos os componentes da parede celular da planta e tem uma eficiência de degradação de lignina particularmente alta. Lignina peroxidases (LiP), manganês peroxidase (MnPs) e versáteis peroxidases (VP) são as principais enzimas para decomposição da lignina. Dois candidatos a MnPs e um candidato a genes VP foram identificados no genoma de *L. edodes* e o gene LiP estava ausente. Além disso, 14 supostos genes codificadores de oxidases, incluindo lacases. Foram identificados 6 genes que codificam outras peroxidases, como L-ascorbato peroxidase, e 24 genes que codificam enzimas auxiliares de degradação da lignina, que podem participar da decomposição da lignina. Em resumo, o genoma de *L. edodes* revelou que 101 modelos de genes estavam potencialmente envolvidos na decomposição da lignocelulose, com composição semelhante ao modelo de fungos da podridão branca.

O crescimento e o desenvolvimento dos cogumelos do gênero *Pleurotus* é baseado no nutriente dos compostos, que fornecem as fontes de carbono disponíveis (STAJIC et al., 2006). O metabolismo do carbono e as vias da glicólise/gliconeogênese medeiam a decomposição e ressíntese dos polissacarídeos nos cogumelos. Na via do metabolismo do carbono, CAZymes, especialmente celulasas e hemicelulasas, estão envolvidos na hidrólise de polissacarídeos da parede celular vegetal e desempenham um papel importante nos processos de degradação do substrato (ANDRE et al., 2014).

A composição dos genes e os mecanismos de degradação da lignocelulose são complexos em fungos da podridão da madeira. Além disso, a expressão desses genes degradadores de celulose, hemicelulose, pectina e lignina pode ser induzida por diversos meios de cultivo. A atividade enzimática extracelular e a capacidade de degradação do

substrato seriam afetadas por vários fatores durante o crescimento do fungo. As sequências do genoma de alguns fungos comestíveis, indicam que há alguma relevância entre a expressão do gene da enzima lignocelulolítica e a variedade dos materiais de cultivo nesses cogumelos comestíveis (KÜES, 2015).

Os basidiomicetos foram amplamente estudados e classificados com base em suas habilidades de decomposição de biomassa vegetal em fungos de podridão branca, podridão parda e podridão mole. Os fungos da podridão branca são os eficientes degradadores da biomassa vegetal, sendo a sua especialidade a degradação de compostos aromáticos, conferindo assim um aspecto branco característico à madeira em decomposição. O genoma de *Phanerochaete chrysosporium* foi a primeira sequência completa do genoma de um basidiomiceto a ser publicada no ano de 2004 (Martinez et al.) que revelou várias informações significativas sobre os mecanismos de degradação da lignocelulose. Após este estudo, sequências completas do genoma de vários fungos basidiomicetos foram reveladas nos últimos anos, contribuindo para um melhor entendimento dessas enzimas e a sua atuação no substrato.

Os fungos são os degradadores mais eficientes da biomassa vegetal e, desempenham assim um papel fundamental na manutenção do ciclo global do carbono. São estudados e aplicados nas indústrias de biocombustíveis, biorrefinaria e biorremediação (Mäkelä et al., 2014). A capacidade de decomposição dos fungos apodrecedores da madeira é diretamente proporcional à sua capacidade de secretar enzimas que degradam a biomassa das plantas. O número total de genes que codificam para enzimas ligninolíticas, celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas revelam que os fungos da podridão branca estão bem equipados com maquinários enzimáticos eficientes para a degradação da lignina. Kameshwar & Qin (2018) sugeriram que os fungos de podridão branca são altamente adequados para a degradação de lignina, outros compostos aromáticos e poluentes ambientais. Portanto, esses mesmos autores afirmam que mais estudos relevantes devem ser realizados para otimizar o crescimento adequado e as condições ambientais para aumentar a expressão e o turnover de proteínas dessas enzimas lignocelulolíticas.

#### 4.2.3.8 Metabolismo secundário

Para os campos da farmacologia e da terapêutica, muito interesse tem sido gerado nos fungos devido aos seus diversos e importantes metabólitos secundários, que comprovadamente possuem propriedades farmacológicas, como atividades imunomoduladoras, antiinflamatórias, antivirais, antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas (ALVES et al., 2012).

Os agrupamentos de genes de metabólitos secundários foram analisados para *P. ostreatoroseus*. Um total de 27 *clusters*, incluindo 10 terpenos, que são enzimas biossintéticas essenciais, 1 poliketideo sintases iterativas tipo III (t3pks), 5 poliketideo sintases iterativas tipo I (t1pks) e 11 outros *clusters* foram identificados. A categoria outros *clusters* significa que tem alguma proteína relacionada ao metabólito secundário, mas não se encaixa em nenhuma categoria específica. Os genes biossintéticos e *clusters* relacionados aos metabólitos secundários estão na figura 15.

Como a maioria dos basidiomicetos, *P. ostreatoroseus* contém poucos genes de poliketideo sintases. Comparado com outros fungos, em *P. ostreatoroseus* não foi identificado nenhum peptídeo não ribossomal (NRPS), assim como em *Ganoderma lucidum* (CHEN et al., 2012) e em *Russula griseocarnosa* (YU et al., 2019). O terpeno é um dos metabólitos secundários mais importantes em fungos, e tem sido amplamente aplicado em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. O terpeno é construído a partir das moléculas simples de cinco precursores de carbono dimetilalil difosfato (DMAPP) e difosfato de isopentenil (IPP), e esses precursores são produzidos a partir de acetil-CoA via do mevalonato (MVA) (YU et al., 2019). Foi possível observar que na via de biossíntese do esqueleto dos terpenóides, *P. ostreatoroseus* possui 13 enzimas principais distribuídas na via de MVA. Todas as enzimas centrais envolvidas na via do MVA estão resumidas na Tabela 8.

Figura 15: Horizontal representa o nome do agrupamento de genes e a vertical mostra o número de agrupamentos de genes. As barras azuis correspondem ao número do gene em cada agrupamento, enquanto as barras vermelhas representam o número de agrupamentos.

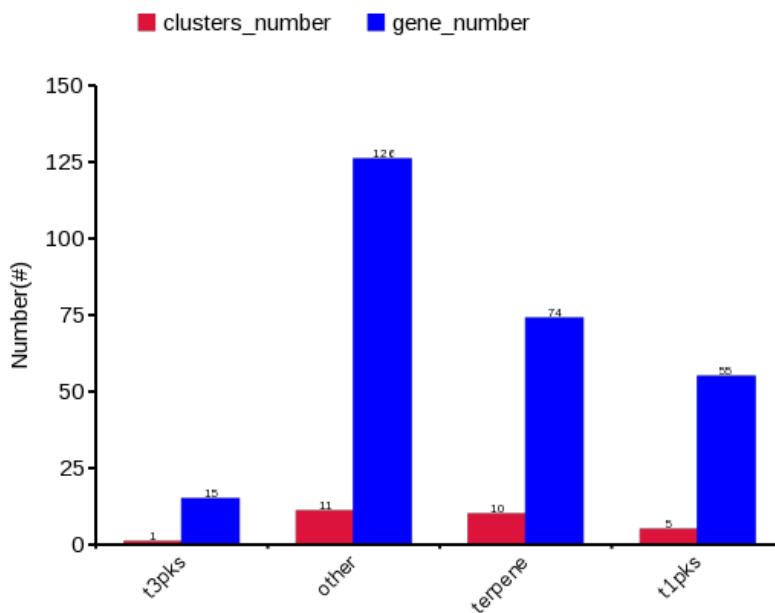


Tabela 8: Genes putativos envolvidos na biossíntese do esqueleto terpenóide.

Gene	Termo KO	EC no.
FDPS; farnesyl diphosphate synthase	K00787	EC: 2.5.1.1; 2.5.1.10
MVD, diphosphomevalonate decarboxylase	mvaD; K01597	EC: 4.1.1.33
FNTA;	protein K05955	EC: 2.5.1.58; 2.5.1.59



farnesyltransferase/geranylgeranyl transferase type-1 subunit alpha		
STE24; STE24 endopeptidase EC:3.4.24.84	K06013	EC: 3.4.24.84
HMGCR; hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)	K00021	EC: 1.1.1.34
atoB; acetyl-CoA C-acetyltransferase	K00626	EC: 2.3.1.9
GGPS1; geranylgeranyl diphosphate synthase, type III	K00804	EC: 2.5.1.1; 2.5.1.10; 2.5.1.29
mvaK2; phosphomevalonate kinase	K00938	EC: 2.7.4.2
E2.3.3.10; hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	K01641	EC: 2.3.3.10
idi; isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase	K01823	EC: 5.3.3.2
FCLY; prenylcysteine oxidase/farnesylcysteine lyase	K05906	EC: 1.8.3.5 1.8.3.6
FNTB; protein farnesyltransferase subunit beta	K05954	EC: 2.5.1.58
SRT1; ditrans, polycis-polyprenyl diphosphate synthase	K19177	EC: 2.5.1.87

Os ácidos ganodéricos triterpenóides foram relatados em *Ganoderma lucidum* como tendo funções antitumorais, imunorreguladoras e antioxidantes (CHEN et al., 2012). Outros exemplos incluem o diterpenóide com atividade antibiótica (pleuromutilina) do cogumelo *Clitopilus passeckerianus* e o sesquiterpenóide com atividade anticâncer (Iludin) isolado de *Omphalotus illudens* e *Lampteromyces japonicus* (ZAIDMAN et al., 2005; POUCHERET et al., 2006; BUTLER, 2008)

Em busca de potencial genes de biossíntese de triterpenóides, foi encontrado uma única cópia gene para lanosterol sintase (LSS; K01852; EC5.4.99.7). LSS é uma enzima da família da oxidosqualeno ciclase que catalisa a ciclização dos triterpenos esqualeno ou 2-3-oxidossqualeno para lanosterol, o precursor de todos esteróides (HUFF & TELFORD, 2005). Essa enzima foi implicada na biossíntese de ácidos ganodéricos, que são os bioativos triterpenos em *G. lucidum* (CHEN et al., 2012) e em *Lignosus rhinocerotis* (YAP et al., 2014).

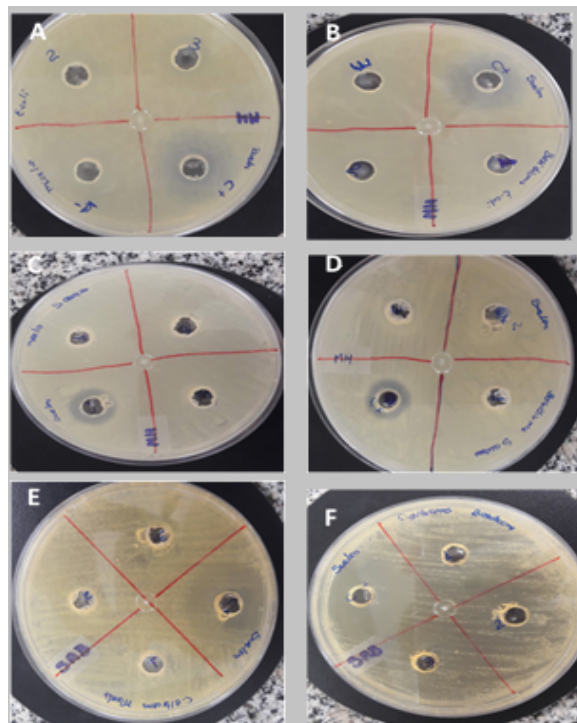
### 4.3 Atividade antimicrobiana

#### 4.3.1 Método de difusão em ágar

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método em difusão em ágar. Usou-se o antibiótico estreptomicina (100 mg/mL) e o antifúngico itraconazol (100 mg/mL) como controles positivos, respectivamente contra as bactérias *Escherichia coli* CBAM 001, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e a levedura *Candida albicans* DPUA 1706. Normalmente, o agente antimicrobiano difunde no meio ágar e inibe a germinação e crescimento do microrganismo testado (BALOUIRI et al., 2016). Logo após, o diâmetro da zona de inibição de crescimento é medido para o milímetro inteiro mais próximo no ponto em que há uma redução proeminente de crescimento de 80% (DAS et al., 2010).

A produção de substâncias antimicrobianas por *P. ostreatoroseus* não foi observada em nenhum dos extratos orgânicos obtidos, tanto do basidioma como da massa micelial, frente às bactérias e levedura testadas (Figura 16). Os testes realizados com o extrato etanólico (1mg/mL) frente a todos os microrganismos-teste foram negativos. Pode-se observar que não houve formação de halo para *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, apenas nos controles positivos, houve a formação de halo.

Figura 16: Ausência de halos de inibição contra: *E. coli* (A- extrato micélio e B- extrato basidioma), *S. aureus*: (C- extrato micélio e D- extrato basidioma) e *C. albicans* (E- extrato micélio e F- extrato basidioma).



Os dados obtidos não mostraram a seletividade da atividade antimicrobiana do biocomposto da espécie quando pareados aos micro-organismos teste, provavelmente esses dados estejam relacionados ao método, as condições de extração dos compostos e também da forma como os fungos foram submetidos a crescimentos. Carvalho (2007) avaliou a influência de diferentes meios de cultivo quanto a produção de biomassa e antimicrobianos dos basidiomicetos *Lentinus edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauroderma sp.* e *Pleurotus sanguineus*. Esse autor observou que não existe um meio ideal para todas as espécies produzirem antimicrobianos, tendo em vista que os resultados dos testes variaram de acordo com o meio de cultivo estudado e o patógeno testado. Além disso, ele concluiu que a produção de biomassa parece não ter relação com a síntese de antimicrobianos.

#### 4.3.2 Teste da Concentração Mínima Inibitória

A CMI determina a menor quantidade do composto bioativo capaz de inibir o crescimento microbiano em condições padronizadas (OLIVEIRA et al., 2009). A determinação da CMI pela técnica de microdiluição tem se demonstrado favorável devido à sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, fatores que proporcionam um maior número de replicações e o aumento da confiabilidade dos dados (OSTROSKY et al., 2008).

Foi realizado o teste de microdiluição dos extratos a fim de identificar a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microorganismos. Os resultados do teste da concentração inibitória mínima (CIM) demonstraram que a concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato etanólico de *P. ostreatoroseus* não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano contra, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* CBAM 001. O mesmo resultado também foi obtido para *Candida albicans* DPUA 1706. O controle positivo utilizado nestes experimentos (antibiótico e antifúngicos 150 µg.ml<sup>-1</sup>), inibiu o crescimento bacteriano e fúngico em 100%. Nesse trabalho, tentamos reproduzir os mesmos experimentos realizado por Correa et al., (2015), onde os corpos de frutificação e o micélio produzidos por cultura submersa foram submetidos a extração com etanol para preparar formulações bioativas. É necessário ressaltar que obtivemos resultados diferentes daquele obtidos pelos autores referidos acima.

Segundo Correa et al., (2015), as formulações bioativas de *P. ostreatoroseus* exibiram atividade antibacteriana e antifúngica contra todas as bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* e *Listeria monocytogenes*) e fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron* e *Penicillium verrucosum* var. *Cyclopium*) testados. O extrato etanólico de *P. ostreatoroseus* do basidioma apresentou maior atividade antibacteriana e antifúngica que o correspondente extrato do micélio contra os microorganismos testados.

Wang e Ng (2004) relataram a atividade de um peptídeo antifúngico isolado de corpos de frutificação de *Pleurotus eryngii*, e Ngai e Ng (2004) relataram efeitos antifúngicos

de uma ribonuclease isolada do basidioma de *Pleurotus pulmonarius*. Nos dois casos, a inibição foi contra *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola*. Tambekar et al., (2006) relataram a capacidade antimicrobiana dos extratos (aquoso, etanol, metanol e xileno) de *Agaricus bisporus* e *Pleurotus sajor caju* contra *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Hearst et al., (2009) não encontraram atividade antimicrobiana no extrato aquoso de *Pleurotus ostreatus* contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Já Nehra et al., (2012), Oyetayo e Ariyo (2013) e Skariyachan et al., (2016) relataram o potencial antimicrobiano dos extratos etanólicos de *P. ostreatus*. Eles encontraram atividades contra os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*.

Bach (2017) analisou o extrato etanólico de nove espécies de cogumelos comestíveis, contra as bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Salmonella enteritidis* e *E. coli*). As bactérias Gram-negativas foram menos sensíveis aos agentes antibacterianos intrínsecos dos cogumelos, necessitando maior concentração desses para que houvesse inibição do seu crescimento. O *Flammulina velutipes*, o *Pleurotus djamor* e o *Pleurotus ostreatus* não apresentaram atividade antibacteriana para as bactérias Gram-negativas, nas concentrações testadas.

Brugnari et al., (2018) relataram atividade antimicrobiana dos extratos de basidiocarpo cozidos e não cozidos de *P. ostreatoroseus* contra 9 microorganismos. O extrato de basidiocarpo não cozido apresentou atividade usando 50 e 75 mg/mL, respectivamente, contra a cepa de *B. subtilis*. Contra a cepa de *S. aureus*, foram encontrados valores de 100 mg/mL e 150 mg/mL, e *C. albicans* foi sensível nas concentrações de 100 e 125 mg/mL (MIC). Os outros microrganismos não foram sensíveis ao extrato. Os extratos de basidiocarpo cozidos não inibiram o crescimento de microrganismos testados nas concentrações avaliadas.

Ainda que uma diversidade de trabalhos utilize a mesma espécie de fungo, os resultados não podem ser previstos, pois mesmo em nível de espécie existem importantes diferenças genéticas que podem influenciar na capacidade de produzir antimicrobianos. Isto pode ser observado no trabalho de Owaid et al., (2015), onde foram obtidos filtrados do

micélio de quatro espécimes de *Pleurotus* e, desses, apenas *P. salmoneostramineus* foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli*.

Os cogumelos contêm diferentes compostos antimicrobianos naturais, como compostos orgânicos aromáticos, derivados do ácido benzóico, ácidos graxos, ácidos orgânicos, ribonuclease, peptídeos, polissacarídeos, proteínas, quinilinas, esteróides, terpenos, (ALVES et al., 2012). A sensibilidade de algumas bactérias para extratos de cogumelos pode ser explicada pela estrutura hidrofílica que elas possuem em seu espaço periplasmático (espaço fluido entre a membrana plasmática e a membrana externa de bactérias gram-negativas), o que faz com que a parede celular seja mais permeável e conseqüentemente, essas bactérias ficam mais vulneráveis ao ataque por cogumelos. Assim, cogumelos que possuem em sua constituição compostos bioativos poderiam suportar aplicações na indústria como fontes acessíveis de compostos antimicrobianos (GYAWALI & IBRAHIM, 2014).

Em plantas, a atividade antimicrobiana dos extratos pode estar relacionada às condições de cultivo, uma vez que os componentes ativos, geralmente substâncias fenólicas, são sintetizados como resposta ao estresse, como ataques de micro-organismos ou radiação UV forte (OLIVEIRA et al., 2016). Bach (2017) observou que os cogumelos *F. velutipes*, o *P. djamor* e o *P. ostreatus* apresentam baixas concentrações de compostos fenólicos e não continham ácido gálico, que pode ser um dos potenciais agentes antibacterianos presente nos cogumelos.

Efeitos antibacterianos de extratos de cogumelos em grande parte dependentes da espécie de cogumelo, suas cepas e formas vegetativas, condições de cultivo, método de preparação do extrato, métodos de avaliação e interpretação dos resultados (DOGAN et al., 2013, CANLI et al., 2019). As espécies de *Pleurotus* têm uma variedade de compostos em diferentes concentrações, e isso explica a diferença de atividade antibacteriana. Muitos pesquisadores relataram que extratos do corpo de frutificação ou biomassa micelial de espécies de *Pleurotus* exibiram atividade antibacteriana contra diferentes microorganismos. Possivelmente estudos utilizando diferentes solventes podem fornecer mais dados sobre a atividade antimicrobiana de *P. ostreatoroseus*.

## 4.4 Atividade antioxidante

### 4.4.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT) e poder antioxidante.

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais substituintes hidroxílicos. Essas hidroxilas são responsáveis pela característica antioxidante desses compostos, pois tem a capacidade de eliminar radicais livres (LIU et al., 2013). O teor de compostos fenólicos totais (CFT) presente na biomassa de *P. ostreatoroseus* é de 19,6 mg EAG/g (Tabela 9). É necessário ressaltar que esses resultados são estimativos do teor de fenólicos totais em equivalente de ácido gálico, pois os diferentes compostos fenólicos podem contribuir de forma diferente na reação química.

No trabalho de Pauli (2010) seis espécies de cogumelo comestíveis foram estudadas quanto seus compostos fenólicos, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Oudemansiella canarii*, *Pleurotus ostreatus*, *P. ostreatusroseus* e *Pleurotus sajor-caju*. O *A. bisporus* e o *O. canarii* foram as variedades que apresentaram, respectivamente, maiores teores de fenólicos totais (6,0 mg EAG/g e 2,8 mg EC/g). Já o cogumelo *P. ostreatoroseus* obteve um teor de 5,9 mg EAG/g, maior que *P. ostreatus* (4,46 mg EAG/g) e *P. sajor-caju* (2,57 mg EAG/g). Dentre as espécies estudadas, o *A. bisporus* e o *P. ostreatoroseus* foram os cogumelos que tiveram as maiores quantidades de compostos fenólicos totais.

Keles et al. (2011) analisaram os CFT de 24 cogumelos e encontraram valores que variaram de 0,42 mg GAE/g (*Hydnum repandum*) a 12,78 mg EAG/g (*Boletus edulis*) (MS). Foi observado também que mesmo os cogumelos analisados sendo da mesma espécie, apresentaram importantes variações na concentração de CFT e atividade antioxidante. Essa variação pode estar correlacionada à subespécie/variedade, coloração do corpo de frutificação e maturação do corpo frutífero dos cogumelos.

Sousa (2012) quantificaram os CFT pelo método de Folin-Cioacalfeu de extratos de quatro espécies de cogumelos comestíveis, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *P. ostreatoroseus* e *Lentinus edodes*, produzidos no Brasil, no período do verão e inverno. Os cogumelos que apresentaram os maiores teores de CFT foram o *P. ostreatus* (10,09 mg EAG/g), seguido do *P. ostreatoroseus* (10,09 mg EAG/g) e do *A. bisporus* (9,07 mg EAG/g para o cultivo do verão e 8,45 mg EAG/g, 9,45 mg EAG/g e 9,60 mg EAG/g para

o cultivo do inverno, respectivamente. Comparando a análise feita nessa pesquisa com os nossos dados, *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 teve um teor de composto fenólico maior (19,6 mg EAG/g).

A atividade antioxidante da biomassa de *P. ostreatoroseus* foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 9. O ensaio de FRAP teve maior poder antioxidante ( $472,6 \pm 9,2$ ), seguido do DPPH ( $324,8 \pm 7,6$   $\mu\text{mol/g TE}$ ) e o ABTS teve o menor resultado ( $84,1 \pm 10,2$   $\mu\text{mol TE/g}$ ). Nesse estudo, a atividade antioxidante também foi medida pelo FRAP, que mede a capacidade de um antioxidante em reduzir o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina,  $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ , a complexo ferroso,  $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ , formando um intenso complexo azul, significando uma maior atividade antioxidante do cogumelo. A redução da capacidade de um composto pode ser considerada um indicador significativo de sua potencial atividade antioxidante. Apesar do extrato avaliado em cada ensaio ser o mesmo, os mecanismos de ação envolvidos nos métodos são diferentes. Ambos os métodos de eliminação radical são populares para a determinação da capacidade antioxidante de produtos alimentícios, devido aos procedimentos simples, rápidos, sensíveis e reprodutíveis (OLIVEIRA et al., 2016).

A atividade antioxidante do *Lentinus edodes* (BACH et al., 2018) foi avaliada pelos métodos de DPPH e ABTS. O ensaio de ABTS apresentou maior poder antioxidante (28,85  $\mu\text{mol TE/g}$ ), enquanto o DPPH obteve o menor resultado (11,48  $\mu\text{mol TE/g}$ ).

A atividade antioxidante de 43 cogumelos foi avaliada por Islam et al., (2016), onde encontraram o maior valor de DPPH de 18,56  $\mu\text{mol/g TE}$  para a espécie de cogumelo *Boletus aereus* e o menor valor de 1,36  $\mu\text{mol/g TE}$  foi para *Tricholoma matsutake*. Os autores observaram que o maior valor de ABTS (109,19  $\mu\text{mol/g TE}$ ) foi para *Umbilicaria esculenta* e o menor valor de 2,25  $\mu\text{mol/g ET}$  foi para *Tremella fuciformis*. Já com FRAP, o maior valor de poder redutor foi para 399,8  $\mu\text{M/g Fe (II)}$  e o menor poder redutor foi de 0,9  $\mu\text{M/g Fe (II)}$ . Apenas duas espécies pertencentes ao gênero *Pleurotus* foram analisadas nesse estudo, *Pleurotus citrinopileatus* e *Pleurotus eryngii*, que tiveram um valor de DPPH de 4.81  $\mu\text{mol/g TE}$  e 11.16  $\mu\text{mol/g}$  e de ABTS de 11.70  $\mu\text{mol/g}$  e 13.61  $\mu\text{mol/g TE}$ , respectivamente. Os extratos das espécies de cogumelos podem ser fontes potenciais de antioxidantes naturais.



Tabela 9: Atividade antioxidante do extrato etanólico de *P. ostreatoroseus*.

<b>Amostra</b>	<b>DPPH (<math>\mu\text{mol/g TE}</math>)</b>	<b>ABTS (<math>\mu\text{mol/g TE}</math>)</b>	<b>CFT (<math>\text{mg EAG/g}</math>)</b>	<b>FRAP (<math>\text{mg EAG/g}</math>)</b>
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	324,8 $\pm$ 7,6	84,1 $\pm$ 10,2	19,6 $\pm$ 0,6	472,6 $\pm$ 9,2

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

Bach et al., (2019) avaliaram a capacidade antioxidante de quatro cogumelos *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Flammulina velutipes* e *Lentinula edodes*. O ensaio DPPH variou de 13,12 a 50,64  $\mu\text{mol/g TE}$ , ABTS de 34,57 a 128,60  $\mu\text{mol/g TE}$  e FRAP de 14,66 a 48,26  $\mu\text{mol/g TE}$ . O extrato de *A. brasiliensis* apresentou maior nível de atividade antioxidante em relação eliminação de radicais livres avaliada pelos métodos DPPH e ABTS, enquanto *A. bisporus* apresentou o nível mais alto para FRAP.

As moléculas de DPPH e ABTS são dois radicais livres estáveis e coloridos, que são receptores tanto de um átomo de hidrogênio como de um elétron para se tornar uma molécula diamagnética estável. Ao receberem um átomo de hidrogênio ou um elétron de um agente antioxidante, como os compostos fenólicos, a forma reduzida do radical é gerada, seguida pela perda de cor. A capacidade de cada extrato de cogumelo descolorir a solução ABTS mostra a potência desses cogumelos na eliminação de radicais orgânicos (ZIELINSKI et al., 2016).

O ensaio de sequestro do radical livre DPPH é um dos mais utilizados para medir a capacidade antioxidante *in vitro*, no entanto existe grande dificuldade em se comparar os resultados aqui obtidos aos encontrados na literatura devido às diferenças existentes entre as metodologias executadas, assim como devido as diferentes formas de expressão dos resultados. Além disso, o método de extração dos compostos fenólicos, a espécie de cogumelo analisada, as condições climáticas as quais os cogumelos foram submetidos e o local onde cresceram interferem enormemente nos resultados finais.

#### 4.5 Composição centesimal

A massa micelial de *P. ostreatoroseus* liofilizada foi caracterizada nutricionalmente e o resultados podem ser observados na Tabela 10. Os carboidratos foram os principais constituintes, seguidos por proteínas e fibras. A amostra possui um teor de

proteína e lipídeos equivalente a 12,53% e 1,43%, respectivamente. Em relação aos teores de proteína, os valores descritos na literatura são altamente variáveis, e o teor descrito nesta pesquisa está dentro do esperado para o gênero *Pleurotus* (10,5 a 30,4%) (FURLANI & GODOY, 2005).

Valores semelhantes ao resultado encontrado neste trabalho foram observados em *Pleurotus ostreatus* cultivado em diferentes substratos. Os valores de proteína variaram de 9,29-14,7% e de lipídeos de 1,18-1,68% (FERNANDES et al., 2015). Para *Flammulina velutipes* foi encontrado também um valor baixo de lipídeos, 1,73% (REIS et al., 2012). Heleno et al. (2015) encontraram um teor de proteínas de 10,65%, 16,0% e 8,08% e de lipídeos de 2,23%, 1,14% e 4,22% para os cogumelos *Boletus edulis*, *Lentinus edodes* e *Xerocomus badius*, respectivamente.

O maior teor de proteína entre as diferentes espécies de *Pleurotus* foi observado para *P. sapidus* (38,5%), com valor comparável ao da soja (35–40%) (ADEBAYO et al., 2014). Além disso, *P. geesteranus* (30,3%), *P. citrinopileatus* (29,4%), *P. sajor-caju* (26,0%), *P. ostreatus* (23,0%) e *P. pulmonarius* (22,9%) possuem teores de proteína comparáveis à proteína de ervilha (20–30%) ou grão de bico (20–25%) (AHMED et al., 2013; MUSIEBA et al. 2013; GOGAVEKAR et al., 2014; HOA et al., 2015). O menor teor de proteína foi registrado para *P. tuber regium* (10,8%), sendo comparável ao sorgo (9-17%), milho (12,9%) e trigo (8-15%) (AKINDAHUNSI & OYETAYO, 2006; DAY, 2013; GONZÁLEZ et al., 2017). É importante destacar que o teor de proteínas do substrato afeta a concentração final no corpo de frutificação (FERNANDES et al., 2015).

Os cogumelos possuem baixos teores de lipídeos, variando de 2 a 10%, em matéria seca (KALAC, 2013). Os alimentos pobres em gordura são fundamentais para dietas saudáveis e com restrição de calorias. Além disso, a maior concentração de ácidos graxos encontrados nos cogumelos é insaturada, entre eles os essenciais, linoleico e oleico (RATHORE et al., 2017).

Valores nutricionais muito distintos foram encontrados por Correa et al., (2015) avaliando o corpo de frutificação de *P. ostreatoroseus*. A análise revelou teores regulares de cinzas (7,6%), além de um ótimo teor de fibra total (45%). O basidioma tinha um alto teor de proteína (26%) e baixo teor de lipídeos (3%).

Segundo Phat et al., (2016) as proteínas do cogumelo contêm todos os nove aminoácidos essenciais requeridos pelo ser humano, possibilitando seu uso como substituto da dieta à base de carne.

Tabela 10: Caracterização centesimal da massa micelial liofilizada de *P. ostreatoroseus*.

Parâmetros	%
Umidade	50,78 ± 0,24
Proteína	12,81 ± 0,09
Lipídeos	1,43 ± 0,11
Cinzas	1,35 ± 0,10
Fibra	3,78 ± 0,09
Carboidratos totais	33,64 ± 0,25
Energia kcal	198,64 ± 1,15

De acordo com Villares et al., (2012), o elevado teor de fibras de cogumelos alcança valores médios entre 4 a 55%, incluindo além das  $\beta$ -glucanas, outros tipos de fibras, como pectina e hemiceluloses. No presente trabalho, foi observado uma quantidade inferior de fibra (3,83%) e de cinzas (1,35%). Fonseca et al., 2014 analisaram a biomassa de *P. ostreatoroseus* e essa possuía um teor de cinzas e fibra de 6,49% e 12,79%. Mshandete & Cuff (2007) obtiveram um teor de cinzas de 6,1% e 11% de fibra, em basidiomas de *Pleurotus flabellatus* cultivado em resíduo de sisal e em basidiomas de *P. djamor* cultivado em palha de bananeira, 6,34% de cinzas e 12,69% de fibra bruta. González et al., (2017) notaram que as espécies de *Pleurotus* possuem uma variação de 2,68% a 15,9% na quantidade de cinzas.

As fibras alimentares destacam-se entre os nutrientes, pois promovem diversos benefícios à saúde humana. A parede celular dos cogumelos é rica em quitina que atua como uma fonte de fibra dietética, junto com seu conteúdo de vitaminas (incluindo tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, ergosterina e niacina), consideráveis teores de micro e macroelementos como fósforo e ferro, carboidratos e teor de muito baixo teor de gordura tornam os cogumelos excelentes alimentos para serem utilizados em dietas de baixa caloria (MAFTOUN et al., 2015).

Os carboidratos foram os principais constituintes de *P. ostreatoroseus*, com teor de 33,64%. Cogumelos são fontes de carboidratos podendo conter de 9 a 88%, em base seca, podem ser digestíveis como manitol, arabitol, trealose, inositol e glicose e não digestíveis como os oligo e os polissacarídeos (ATRI et al., 2013; WANG et al., 2014). As espécies com maior teor de carboidratos já registrados para o gênero *Pleurotus* foram *P. eryngii* (75,4%), *P. giganteum* (65,9%), que eram comparáveis à farelo de aveia (66%) e grãos de trigo (73%) (REIS et al., 2012; PHAN et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2017).

Corpos de frutificação frescos de *Pleurotus spp* contêm 85 e 90% de umidade (KHAN & TANIA, 2012), e a porcentagem de umidade depende da espécie de cogumelos além de outros parâmetros relacionados à colheita, substrato, crescimento e condições de armazenamento. O valor encontrado neste estudo para umidade foi relativamente menor (55,78%) comparado a estudos que analisaram o corpo de frutificação. O teor de umidade dos cogumelos frescos é muito elevado, o que pode afetar a textura, facilitar o desenvolvimento de microrganismos e diminuir o prazo de validade, além de interferir na concentração dos compostos (REIS et al., 2012). É necessário ressaltar que a maioria dos trabalhos publicados com as análises centesimais de cogumelos são feitos a partir do basidiomas desidratados, diferente do que foi analisado nesta pesquisa, onde foi utilizado a massa micelial liofilizada.

Quanto à energia total, a massa micelial de *P. ostreatoroseus* possui 198,64 kcal. Fonseca et al., (2014) encontraram uma média 309,7 kcal em *P. ostreatoroseus* enquanto *P. ostreatus* apresentou 385 kcal (FERNANDES et al., 2015).

Furlani e Godoy (2007), analisaram a composição centesimal de diferentes lotes de cogumelos (*Agaricus blazei*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinus edodes*) comprados nas cidades de Campinas e São Paulo. A composição de todas as espécies analisadas, os carboidratos foram os principais constituintes nutricionais apresentando um teor médio de 63,17%, em base seca. O *A. blazei* apresentou os maiores valores de proteína (28%), seguido de *L. edodes* com 19% e *P. ostreatus* com 22%. Outro fator importante foi o baixo teor de lipídeos, em que a média para as três espécies ficou ao redor de 5%. O teor de fibra alimentar para os cogumelos foi alto, apresentando um teor médio de 34% para as três espécies. Os

autores observaram que houveram diferenças nas composições centesimais para os diferentes lotes de cada espécie.

Rampinelli et al., (2010) determinaram a composição físicoquímica dos basidiomas de *Pleurotus djamor*, o teor de proteína foi de 20,5% e o teor de lipídios igual a 1,12%. Assim como *P. djamor* outras espécies apresentaram um baixo teor de gordura como *P. ostreatus* (0,88%), *P. sajor-caju* (0,30% e 0,54%) e *P. florida* (0,9% e 1,2%).

Kirsch (2013) notou que a biomassa de *Pleurotus albidus* continha um teor de cinzas de 8,18% e lipídios de 2,66%. Carboidratos, proteínas e fibras foram os componentes predominantes na biomassa de *P. albidus*, representando, 68,75%, 20,41% e 18,55%, respectivamente. A autora ressaltou que o teor de proteínas da biomassa desidratada de *P. albidus* foi similar ao de outras fontes proteicas consumidas comumente pelo homem, como a sobrecoxa de frango (15,2%) e queijo minas (17,4%).

Fonseca et al., (2014) observaram que *P. ostreatoroseus*, apresentou 3,08% de lipídios, valor dentro do observado para biomassa de cogumelos em base seca (1,1 e 8,3%) e próximo ao determinado em *P. ostreatus* comercializado em São Paulo (4,30%) (FURLANI & GODOY, 2007; BERNARDI et al., 2009). Para o mesmo cogumelo, o teor de cinzas e fibra bruta foi 6,49% e 12,79%, valores próximos ao encontrando por Mshandete & Cuff (2007), 6,1% de cinzas e 11% de fibra, em basidiomas de *Pleurotus flabellatus* cultivado em resíduo de sisal e em basidiomas de *P. djamor* cultivado em palha de bananeira, 6,34% de cinzas e 12,69% de fibra bruta.

A composição nutricional dos cogumelos não é uniforme entre si, ainda que algumas características sejam generalizadas. Podem ocorrer variações quantitativas e qualitativas inter e mesmo intraespécie de acordo com o tipo de cogumelo, composição do meio de cultura, período em que é efetuada a colheita e preparação dos substratos. Por essa razão, podem-se encontrar diferenças na composição entre cogumelos selvagens e cultivados, ainda que dentro da mesma espécie. Esses fatores exercem grande influência em seu conteúdo protéico (SEABRA, 2015; SUN et al., 2017).

Embora haja uma grande diferença na composição, dependendo das espécies e dos meios de cultivo utilizados para a produção de cogumelos comestíveis, esses podem ser considerados excelentes alimentos devido às características nutricionais, pois apresentam

alto teor de proteínas e carboidratos e baixos teores de gordura, resultando em um baixo valor calórico. Os cogumelos têm consideráveis quantidades de fibras alimentares e podem ser consideradas fontes de aminoácidos essenciais (RATHORE et al., 2017).

## 5 CONCLUSÃO

A sequência de genoma forneceu informações importantes sobre a biologia de *Pleurotus ostearoseus*. A montagem dos dados de sequenciamento apresentou um genoma de qualidade com o tamanho estimado de 38.6 Mb.

As anotações revelaram o potencial genômico para degradação da lignina e biorremediação. Além disso, foi possível evidenciar particularmente os genes envolvidos na biossíntese de terpenos, promissores para pesquisas biotecnológicas por serem potenciais antitumorais, anti-oxidantes e anti-inflamatórios.

O extrato etanólico obtido, tanto da massa micelial como do basidioma, não tiveram atividade antimicrobiana. E quanto a atividade antioxidante, *P. ostearoseus* possui uma boa concentração de CFT e, com relação aos métodos empregados, o FRAP foi o que teve maior atividade antioxidante comparado ao DPPH e ABTS.

A composição da massa micelial liofilizada contém teores de proteínas, carboidratos e lipídios, compatíveis com outras espécies de *Pleurotus*. Portanto, o cogumelo comestível estudado mostra-se um alimento rico nutricionalmente, além de apresentar compostos bioativos, como  $\beta$ -glucanas, aminoácidos essenciais e compostos fenólicos.

Este trabalho servirá como base para futuros projetos, particularmente quanto às suas aplicações biotecnológicas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, N. et al. Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

ABREU, H. et al. Gelling functional property, anti-inflammatory and antinociceptive bioactivities of  $\beta$ -Dglucan from the edible mushroom *Pholiota nameko*. **Int. J. Biol. Macromol**, v.122, p.1128-1135, 2019.

ADEBAYO, E.A. et al. Assessment of the genetic diversity among ten genotypes of *Pleurotus* (oyster mushroom) using nutrient and mineral compositions. **Sci. Hortic.**, v. 166, p. 59-64, 2014.

ADEBAYO, E.A.; MARTINEZ-CARRERA, D. Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 52-67, 2015.

AHMED, M. et al. Yield and nutritional composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, p. 197-202, 2013.

AKATA, I. et al. Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the Agaricaceae family. **S. Afr. J. Bot.**, v.120, p. 95-99, 2019.

AKINDAHUNSI, A.A.; OYETAYO, F.L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) Singer. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 39, p. 548-553, 2006.

ALTSCHUL, S.F. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, M. J. et al. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Planta medica**, v. 78, n.16, p. 1707-1718, 2012.

ALVES, M.J. et al. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.

ALZAND, K.I. et al. Chemical Composition and nutritional value of edible wild growing mushrooms: a review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 31-46, 2019.



AMOS, B.; ROLF, A. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 45-48, 2000.

AN, H. et al. Molecular characterization of 170 new gDNA-SSR markers for genetic diversity in button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Mycobiology**, v. 47, n. 4, p. 527-532, 2019.

ANDLAR, M. et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Science**, v.18, p. 768-778, 2018.

ANDRE, I. et al. CAZyme discovery and design for sweet dreams. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.19, p.17-24, 2014.

ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. **Nature genetics**, v. 25, n.1, p. 25-29, 2000.

ASPEBORG, H. et al. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). **BMC Evol. Biol.**, v. 12, p. 186, 2012.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: 1-1141. AOAC, Arlington, 2006.

ATRI, N. et al. Nutritional and nutraceutical composition of five wild culinary-medicinal species of genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) from northwest India. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 15, n. 1, p. 49-56, 2013.

AVIN, F.A. et al. Molecular Divergence and Species Delimitation of the Cultivated Oyster Mushrooms: Integration of IGS1 and ITS. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 10, 2014.

BACH, F. Avaliação do potencial nutricional, antioxidante e antibacteriano de cogumelos comestíveis. **Tese**, p. 134, 2017.

BACH, F. et al. Bio compounds of edible mushrooms: In vitro antioxidant and antimicrobial activities. **LWT- Food Science and Technology**, v. 107, p. 1-24, 2019.

BADOTTI, F. et al. ITS and secondary biomarkers in fungi: review on the evolution of their use based on scientific publications. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 471-479, 2018.

BALOURI, M. et al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BAO, D. et al. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

BARBOSA, A. C. D. O. F. Evaluation of compatibility criteria among primers pairs for optimizing multiplex genotyping systems. **Dissertação**, p. 77, 2010.

BARBOSA, E.E. et al. Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 92475-92485, 2020.

BENSON, D.A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 30-35, 2015.

BERNARDI, E. et al. Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 901-907, 2009.

BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. Cultivo de *Pleurotus Sajor-caju* em diferentes substratos pasteurizados. **Arq. Inst. Biol.**, v.78, n.2, p.217-223, 2011.

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnol. Adv.** v.30, p.1575-1588, 2012.

BLUMFIELD, M. Examining the health effects and bioactive components in *Agaricus bisporus* mushrooms: a scoping review. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 84, p. 108453, 2020.

BONA, E.A.M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BONATTI, M. et al. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v.88, n. 3, p. 425-428, 2004.

BORGOGNONE, A. et al. Distribution, Characteristics, and Regulatory Potential of Long Noncoding RNAs in Brown-Rot Fungi. **International Journal of Genomics**, v. 2019, p. 1-12, 2019.

BRUGNARI, T. et al. Atividade antioxidante do extrato aquoso do cogumelo comestível *Pleurotus Ostreatus*. **Revista UNINGÁ**, v. 25, n.3, p. 46-50, 2016.

BRUGNARI, T. et al. Effects of cooking and *in vitro* digestion on antioxidant properties and cytotoxicity of the culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 3, p. 259-270, 2018.

BRUNS, T. D. et al. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, p. 525–564, 1991.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 25, p. 475–516, 2008.

CAETANO, A.C.S. Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (*Malpighia Emarginata* D. C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa do óleo de soja. **Dissertação**, 2009.

CANLI, K. et al. In vitro Antimicrobial Activity of *Morchella esculenta* and *Trametes versicolor*. **The Journal of Fungus**, v. 10, p. 28-33, 2019.

CARBON, S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics Applications Note**, v. 25, n. 2, p. 288-289. 2009.

CARBONERO, E.R. et al. A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 252-257, 2006.

CARVAJAL, A.E.S.S. et al. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. **LWT – Food Science Technology**, v. 46, p. 493-499, 2012.

CARVALHO, M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinus edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauroderma sp.* e *Pleurotus sanguineus*. **Dissertação**, p. 102, 2007.

CASTANERA, R. et al. Transposable elements versus the fungal genome: Impact on whole-genome architecture and transcriptional profiles. **PLOS Genet.** v. 18, n.12, p. 4710-4726, 2016.

CHEN, S.L. et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Nature communications**, v. 3, p. 913, 2012.

CHEN, Y. et al. Polysaccharides from traditional chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1705, 2016.

CHEN, L. et al. Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation. **PLoS One**, v.11, n. 8, p. e0160336, 2016.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, second edition. **CLSI document M38-A2**, v, 28, n. 16, 2008.

CORRAL-BOBADILLA, M. Bioremediation of Waste Water to Remove Heavy Metals Using the Spent Mushroom Substrate of *Agaricus bisporus*. **Water**, v.11, n. 3, p. 454, 2019.

CORRE, C.; CHALLIS, G.L. New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 977–986, 2009.

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

COSTELLO, M.J. et al. Can we name Earth's species before they go extinct? **Science**, v. 339, p. 413-416, 2013.

CRAFT, B.D. et al. Phenol- Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, n. 2, p. 148-173, 2012.

CRISTANCHO, M.A. et al. Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 594-595, 2014.

CUOMO, C.A. et al. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. **Science**, v. 317, n. 5843, p. 1400-1402, 2007.

DAI, Y. et al. *Pleurotus eryngii* genomes reveal evolution and adaptation to the Gobi desert environment. **Front Microbiol.**, v. 10, p. 1-11, 2019.

DAS, K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DAY, L. Proteins from land plants-Potential resources for human nutrition and food security. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 32, p. 25-42, 2013.

DEAN, R.A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 980-986, 2005.

DEHGHAN, E. et al. Review of new insights into antimicrobial agents. **Cellular and Molecular Biology**, v. 63, p. 40, 2017.

DIAZ-SANCHEZ, S. et al. The future of molecular genetics in poultry production and food safety. **Poultry Science, Champing**, v. 92, n. 2, p. 562-572, 2013.

DOGAN, H. et al. Antimicrobial activities of some mushrooms in Turkey. **Pharmaceutical biology**, v. 51, p. 707-11, 2013.

ELKHATEEB, W.A. et al. Medicinal mushrooms as a new source of natural therapeutic bioactive compounds. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 2, p. 88-101, 2019.

EL-METWALLY, S. et al. Next-Generation Sequence Assembly: Four Stages of Data Processing and Computational Challenges. **PLOS Computational Biology**, v. 9, n. 12, p. e1003345, 2013.

FELL, J.W. Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. **Mol. Mar. Biol. Biotechnology**, v. 2, p.174-180,1993.

FERNANDES, A. Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. **Food Chem.**, v. 169, p. 396-400, 2015.

FERRARO, V. et al. Cultivated mushrooms: importance of a multipurpose crop, with special focus on Italian fungiculture. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, p. 1-11, 2020.

FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nat Rev Genet.** v. 9, p. 397-405, 2008.

FIERER, N. et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 109, p. 21390-21395, 2012.

FLOUDAS, D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, v. 336, p. 1715-1719, 2012.

FONSECA, T.R.B. et al. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 8, n. 01, p. 1227-1236, 2014.

FONSECA, T.R.B. et al. Cultivation and nutritional studies of and edible mushroom from north Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p. 1814-1822, 2015.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Nutritional value of edible mushrooms: a review. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Nutritional value of edible mushrooms. **Ciencia Tecnol. Alimento**, v. 27, n.12, p. 154-157, 2007.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, 2003.

GARDNER, P.P. et al. Rfam: updates to the RNA families database[J]. **Nucleic acids research**, v. 37 p. D136-D140, 2009.

GASECKA, M. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 242, p. 723-732, 2016.

GEHRIG, I. et al. Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*. **Biotechnol Bioeng**, v. 59, n. 5, p. 525-533,1998.

GOGAVEKAR, S.S. et al. Important nutritional constituents, flavour components, antioxidant and antibacterial properties of *Pleurotus sajor-caju*. **J. Food Sci. Technol.**, v. 51, p. 1483-1491, 2014.

GOLAK-SIWULSKA, I. et al. Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus sp.*). **Folia Hort.**, v. 30, n. 2, p. 191-201, 2018.

GOMES, D. et al. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa & Tecnologia**, v.13, n. 1, p. 1-6, 2016.

GONG, W. et al. Whole genome sequence of an edible and medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (Basidiomycota, Fungi). *Genomics*, v. 112, p. 2393-2399, 2020.

GONZÁLEZ, J.A.C. et al. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingrediente. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 69-81, 2017.

GUIMARÃES, D.O. et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HAMINIUK, C.W.I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 1-22, 2012.

HAN, M. et al. The whole-genome sequence analysis of *Morchella sextelata*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 15376, p. 1-11, 2019.

HAZAMA, S. et al. Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer. **Anticancer Res.**, v. 29, p. 2611-7. 2009.

HEARST, R. et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, p. 5-7, 2009.

HELENO, S.A. et al. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. **Food bioscience**, v. 11, p. 48-55, 2015.

HOA, T.H. et al. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**, v.43, p.14-23, 2015.

HUANG, Z. et al. Identification of differentially expressed long non-coding RNAs in polarized macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-10, 2016.

HUANG, S. et al. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* promote cognitive function and neural progenitor proliferation in mouse model of Alzheimer's disease. **Stem Cell Reports**, v. 8, n.1, p. 84-94, 2017.

HUFF, M.W.; TELFOR, D.E. Lord of the rings – the mechanism for oxidosqualene: lanosterol cyclase becomes crystal clear. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 26, p.335-340, 2005.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 1985.

ISLAM, T. et al. Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. **LWT-Food Science and Technology**, v. 72, p. 423-431, 2016.

JUNG, S. et al. The Genome Database for Rosaceae (GDR): 10 year update. **Nucl. Acids Res.**, v. 42, n. 1, p. 1237-1244, 2014.

KAEWNARIN, N. et al. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 352-364, 2016.

KALAC, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 209-218, 2013.

KAMESHWAR, A.K.S.; QIN, W. Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in White rot, brown rot and soft rot fungi. **Mycology**, v. 9, n. 2, p. 93-105, 2018.

KANEHISA, M. et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. **Nucleic acids research**, v. 32, p. D277-D280, 2004.

KANEHISA, M. et al. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. **Nucleic acids research**, v. 34, p. D354-D357, 2006.

KELES, A. et al. Antioxidant properties of wild edible mushrooms. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 2, n. 6, p. 1-6, 2011.

KELLER, O. et al. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v. 27, p.757-763, 2011.



KERSEY, P.J. et al. Ensembl Genomes 2013: scaling up access to genome-wide data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 2, p. 546-552, 2014.

KHAN, M.A.; TANIA, M. Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: an overview. **Food Reviews International**, v. 28, p. 313-329, 2012.

KIMATU, B.M. et al. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. **Food Chem.**, v. 230, p. 58-67, 2017.

KIRSCH, L.S. Avaliação da qualidade nutricional e microbiológica da biomassa de *Pleurotus albidus* produzida por fermentação submersa. Tese, p. 126, 2013.

KLANCNIK, A. et al. Aqueous Extracts of Wild Mushrooms Show Antimicrobial and Antiadhesion Activities against Bacteria and Fungi. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 12, p. 1971-1976, 2017.

KNOP, D.; YARDEN, O.; HADAR, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1025-1038, 2015.

KOUTROTSIOS, G. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 98, 2017.

KOHLER, A. et al. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. **Nat Genet.**, v. 47, p. 410-5, 2015.

KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current opinion in biotechnology**, v.33, p. 268-278, 2015.

KUI, L. et al. Genome assembly and analyses of the macrofungus *Macrocybe gigantea*. **Biomed Res Int.**, v. 18, p.1-14, 2021.

KUMANAYA, D.R.G. et al. A cultura e a territorialidade do cultivo de cogumelos em Mogi das Cruzes. **Revista Eletrônica Anima Terra**, n. 7, p.1-13, 2018.

KURATA, A. et al. Draft genome sequence of the basidiomycetous fungus *Flammulina velutipes* TR19. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p. 00505-16, 2016.

KUSHAIRI, N. et al. Comparative neuroprotective, anti-inflammatory and neurite outgrowth activities of extracts of king oyster mushroom, *Pleurotus eryngii* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 22, n. 12, p. 1171-1181, 2020.

LABBÉ, J. et al. Survey and analysis of simple sequence repeats in the *Laccaria bicolor* genome, with development of microsatellite markers. **Curr Genet.**, v. 57, n. 2, p. 75-88, 2011.

LACERDA, K.C.D. Potencial terapêutico de formulação antidiabética oral em modelo experimental de diabetes tipo 1: avaliações renais e hepáticas. **Dissertação**, p. 110, 2018.

LAGESEN, K. et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 9, p. 3100-3108, 2007.

LAM, K.-L. The diploid genome of the only sclerotia-forming wild type species in the genus *Pleurotus*-*Pleurotus tuber-regium* provides insights into the mechanism of its biomass conversion from lignocellulose substrates. **Journal of biotechnology**, v. 283, p.22–27, 2018.

LANGSTON, J.A. et al. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 7007-7015, 2011.

LEE, Y. et al. Genome sequence of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* strain PC9. **G3 Genes Genomes Genetics**, v. 11, n.2, p. 1-7, 2020.

LI, W. et al. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. **Bioinformatics**, v. 18, n.1, p. 77-82, 2002.

LI, Y-C. et al. Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 991-1007, 2004.

LI, R. et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. **Bioinformatics**, v. 25, p.1966-1967, 2009.

LI, Y. et al. Comparison of different sequencing and assembly strategies for a repeat-rich fungal genome, *Ophiocordyceps sinensis*. **J. Microbiol Methods**, v. 128, p.1-6, 2016.

LI, S.; BREAKER, R.R. Identification of 15 candidate structured noncoding RNA motifs in fungi by comparative genomics. **BMC Genomics**, v. 18, n. 785, 2017.

LI, H. et al. The Genome Sequences of 90 Mushrooms. **Scientific Reports**, v. 8, p. 9982, 2018.

LIMA, C.U.J.O. et al. Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* - integrative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p.780-786, 2016.

LIN, H. C. et al. Anroquinonol, a ubiquinone derivative from the mushroom *Antrodia camphorata*, inhibits colon cancer stem cell-like properties: insights into the molecular mechanism and inhibitory targets. **J. Agric. Food Chem.**, v. 65, n.1, p. 51-59, 2017.

LINDAHL, B.D. et al. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers a user's guide. **New Phytol**, v.199, p. 288-299, 2013.

LIU D.B. et al. The genome of *Ganoderma lucidum* provides insights into triterpenes biosynthesis and wood degradation. **PLoS One**, v. 7, p. 36146, 2012.

LIU, T. et al. Identification and characterisation of non-coding small RNAs in the pathogenic filamentous fungus *Trichophyton rubrum*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 931, p. 1-11, 2013.

LIU, J. et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 310-316, 2013.

LIU, S.R. et al. Production of stalk spawn of an edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in liquid culture as a suitable substitute for stick spawn in mushroom cultivation. **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 572–577, 2018.

LOFTUS, B.J. et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1321-1324, 2005.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. D490–D495, 2014.

LOWE, T.M.; EDDY, S.R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. **Nucleic acids research**, v. 25, n.5, p. 0955-964, 1997.

MACDONALD, S.S et al. N-acetylglucosaminidases from CAZy family GH3 are really glycoside phosphorylases, thereby explaining their use of histidine as an acid/base catalyst in place of glutamic acid. **J. Biol. Chem.** v. 290, p. 4887-4895, 2015.

MACHADO, A.R.G. et al. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 46, p. 2160-2166, 2017.

MAFTOUN, P. et al. The edible mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and nutritional values. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 4, p. 67-83, 2015.

MAITY, P. et al. Structure elucidation and antioxidant properties of a soluble beta-d-glucan from mushroom *Entoloma lividoalbum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 140-149, 2014.

MAITY, G.N. et al. Structural features and antioxidant activity of a new galactoglucan from edible mushroom *Pleurotus djamor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 743-749, 2021.

MÄKELÄ, M.R. et al. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.72, 2014.

MANIAN, S. et al, DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. **Letters in applied microbiology**, v. 33, n. 4, p. 307-310, 2001.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 695-700, 2004.

MARTÍNEZ-IBARRA, E. et al., Climatic and socioeconomic aspects of mushrooms: The case of Spain. Barcelona: Espanha, 2019. **Sustainability**, v. 11, p. 1030, 2019.

MEDEMA, M.H. et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. **Nucleic acids research**, v. 39, p. W339-W346, 2011.

METZKER, M.L. et al. Sequencing technologies - the next generation. **Nat. Ver. Genet.**, v.11, n.1, p. 31-46, 2010.

MIDORIKAWA, G. et al. Molecular Identification and Detection of Foodborne and Feedborne Mycotoxigenic Fungi. **Molecular Techniques in Food Biology**, p. 385-407, 2018.

MIKIASHVILI, N. et al. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 999-1002, 2006.

MILLER, J.R. et al. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, v. 95, p. 315–327, 2010.

MILTON, S.J. et al. The Transporter Classification Database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D251-8, 2014.

MINGYI, Y. et al. Trends of utilizing mushroom polysaccharides (MPs) as potent nutraceutical components in food and medicine: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 94-110, 2019.

MIZUNO, M.; NISHITANI, Y. Immunomodulating compounds in basidiomycetes. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 52, p. 202-207, 2013.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 50, n. 2, 2004.

MORADALI, M.F. et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 701-24, 2007.

MORIN, E.I. et al. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.109, n. 43, p. 17501-6, 2012.

MORRIS, J.H. et al. Mycelia from *Pleurotus sp.* (oyster mushroom): a new wave of antimicrobials, anticancer and antioxidant bio-ingredients. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 4, p. 3, 2017.

MOTA, A.J.; NOBREGA, F.G. Unequivocal Identification of Fungi, Especially *Candida* and Related Species of Medical Interest. **Journal of Medical Diagnostic Methods**, v. 2, n. 5, p. 1-13, 2013.

MSHANDETE, A.M.; CUFF, J. Proximate and nutrient composition of three types of indigenous edible wild mushrooms grown in Tanzania and their utilization prospects. **Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.**, p. 7 n. 6, p.1-16, 2007.

MUSIEBA, F. et al. Proximate composition: amino acids and vitamins profile of *Pleurotus citrinopileatus*: An indigenous mushrooms in Kenya. **Am. J. Food Technol.**, v. 8, p. 1-7, 2013.

MYROL, D.D. et al. The potential of metagenomic approaches for understanding soil microbial processes. **Soil Science Society of America Journal**, v.78, p. 3-10, 2014.

NAGY, L. G. et al. Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. **Mol Biol Evol.** v. 33, p. 959-70, 2016.

NAKAJIMA, M. et al. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoside hydrolase from *Ustilago esculenta* functions in beta-1,3-glucan degradation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 5682-5689, 2012.

NAWROCKI, E.P. et al. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. **Bioinformatics**, v. 25, n. 10, p.1335-1337, 2009.

NEHRA, K. et al. Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (Oyster Mushroom). **International Journal of Microbial Resource Technology**, v. 1 n. 4, p. 391-400, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NGUYEN, N.H. et al. Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. **New Phytol**, v. 205, p. 1389–1393, 2015.

NILSSON, R.H. et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. D259-D264, 2019.

OLI, A. N. et al. Evaluation of the phytoconstituents of *Auricularia auricula-judae* mushroom and antimicrobial activity of its protein extract. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 38, p. 101176, 2020.

OLIVEIRA, T.F. et al. Concentração mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento**, v. 49, p. 1-16, 2009.

OLIVEIRA, D.A. et al. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis sp.*) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **J. Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55-62, 2016.

OWAID, M.N. Antimicrobial Activity of Mycelia of Oyster Mushroom Species (*Pleurotus spp.*) and their Liquid Filtrates (*In Vitro*). **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 4, n. 5, p. 376-380, 2015.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OYETAYO, O. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 380-386, 2009.

OYETAYO, O.; ARIYO, O.O. Antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) cultivated on different tropical woody substrates. **Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology**, v. 1, p. 28-32, 2013.

ÖZDAL, M. et al. Antibacterial and antioxidant activity of mycelial extracts of different *Pleurotus* species. **Food and Health**, v. 5, n.1, p. 12-18, 2019.

PALMER, J. Funannotate: pipeline for genome annotation. 2019.

PANDYA, U. et al. Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. **Nature Product Research**, v. 33, p. 2668-2680, 2019.

PAULI, P.A. Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis. **Dissertação**, p. 73, 2010.

PAZZA, A.C.V. et al. Composição nutricional e propriedades funcionais fisiológicas de cogumelos comestíveis: *Agaricus brasiliensis*, *Pleurotus ostreatus*. **FAG Journal of Health**, v.1, n.3, p.240, 2019.

PEREIRA, A.B.; PUTZKE, J. Famílias e gêneros de fungos Agaricales (Cogumelos) no Rio Grande do Sul. Santa Cruz do Sul: Livraria e Editora da FISC, 188p, 1989.

PHAN, C.W. et al. Intrastrain comparison of the chemical composition and antioxidant activity of an edible mushroom *Pleurotus giganteus*, and its potent neurotogenic properties. **Sci. World J.**, p. 1-11, 2014.

PHAT, C. et al. Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1068-1077, 2016.

PORTO, B. Sequenciamento do genoma e identificação de candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix*. Dissertação, p. 119, 2016.

POUCHERET, P. et al. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. **Mycologie**, v. 27, p. 311-333, 2006.

PULIDO, R. et al. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

PUTZKE, J. Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (Agaricales, Basidiomycota, Fungos) no Brasil - I: lista de espécies e chaves de identificação. **Caderno de Pesquisas Série Biologia**, v. 14, n. 1, p. 67-75, 2002.

PUTZKE, J. et al. Nova técnica de cultivo de cogumelos (*Pleurotus spp.*) utilizando recipientes de colmos de bambu para a pequena propriedade rural. **Agricultura Familiar: Pesquisa, Formação e Desenvolvimento**, v.13, n. 1, p. 103-111, 2019.

QU, J. et al. Identification and characterization of small noncoding RNAs in genome sequences of the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

RADZKI, W. et al. Effect of blanching and cooking on antioxidant capacity of cultivated edible mushrooms: A comparative study. **International Food Research Journal**, v. 23. p. 599-605, 2016.

RAJA, H.A. et al. Fungal identification using molecular tool: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

RAMAN, J. et al. Current prospects of mushroom production and industrial growth in India. **J. Mushrooms**, v.16, n. 4, p. 239-249, 2018.

RAMAKRISHNAN, M. et al. Investigation of lovastatin, the anti-hypercholesterolemia drug molecule from three oyster mushroom species. **International Journal of Biomedical and Clinical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 26-31, 2018.



RAMPINELLI, J. et al. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 197-202, 2010.

RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: a review. **Pharma Nutr.**, v. 5, p. 35-46, 2017.

RATHORE H. et al. Medicinal importance of mushroom mycelium: mechanisms and applications. **J. Funct. Foods**, v. 56, p. 182-193, 2019.

RE, R. et al. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REIS, M.F. et al. Análise de substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.2, p. 79-91, 2010.

REIS, F.S. et al. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, 191-197, 2012.

REIS, M.F.; ROCHA, C.L.M.S.C. Efeito de extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre o desenvolvimento vegetativo de *Aspergillus nidulans*. **SaBios: Rev. Saúde e Biologia**, v. 11, n. 2, p. 42-52, 2016.

REN, D. et al. Chemical composition of *Pleurotus eryngii* polysaccharides and their inhibitory effects on high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in mice. **Food Function**, v. 5, p. 2609-2620, 2014.

RILEY, R. et al., Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 111, n. 27, p. 9923-9928, 2014.

ROSADO, F. R. et al. Alternative method of inoculum and spawn production for the cultivation of the edible Brazilian mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* SINGER. **J. Basic Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 37-44, 2002.

ROY, D. *In vitro* search for antiviral activity against human cytomegalovirus from medicinal mushrooms *Pleurotus* sp. and *Lentinus* sp. **Journal of Antivirals and Antiretrovirals**, v. 12, p. 1-7, 2020.

RUNGJINDAMAI, N. et al. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal diversity**, v. 33, p. 139-161, 2008.

SAJON, S. et al. Mushrooms: Natural factory of anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and nutrition. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.7, n. 1, p. 464-475, 2018.

SAKAMOTO, Y. et al. Characterization of the *Lentinula edodes* *exg2* gene encoding a lentinan-degrading exo- $\beta$ -1,3-glucanase. **Curr. Genet.**, v. 47, p. 244-252, 2005.

SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977(a).

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. **Nature**, v. 265, p. 687-695, 1977(b).

SATHYA, T.A.; KHAN, M. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. **Journal of food science**, v. 79, p. R2149-R2156, 2014.

SCHOCH, C.L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proc. Natl. Acad. Science**, v. 109, p. 6241-6246, 2012.

SEABRA, A.L. Cogumelos e saúde. **Dissertação**, p. 82, 2015.

SHARIF, S. et al. Wild Mushrooms: A Potential Source of Nutritional and Antioxidant Attributes with Acceptable Toxicity. **Prev. Nutr. Food Sci.**, v. 22, n. 2, 124-130, 2017.

SHARMA, S.K.; GAUTAM, N. Chemical, bioactive, and antioxidant potential of twenty wild culinary mushroom species. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

SHASHIDHAR, G.M. et al. Antioxidant and Cholesterol Esterase Inhibitory Properties of Supplementation with Coconut Water in Submerged Cultivation of the Medicinal Chinese Caterpillar Mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* CS1197 (Ascomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 4, p. 337-345, 2017.

SHIM, D. et al. Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*. **J. Biotechnol.**, v. 223, p. 24-25, 2016.

SHIMA, D. et al., Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*. **Journal of Biotechnology**, v. 223, p. 24-25, 2016.

SINGH, P.K. et al. Clinical Significance and Molecular Characterization of Nonsporulating Molds Isolated from the Respiratory Tracts of Bronchopulmonary Mycosis Patients with Special Reference to Basidiomycetes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3331-3337, 2013.

SILVA, A.C.; Jorge, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. *Cient Ciênc Biol Saúde*, v.13, p. 375-84, 2011.

SKARIYACHAN, S. et al. Exploring the medicinal potential of the fruit bodies of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes), against multidrug-resistant bacterial isolates. **Int. J. Med. Mushrooms**, v.18, p. 245-52, 2016.

SONNENBERG, A.S.M. et al. A detailed analysis of the recombination landscape of the button mushroom *Agaricus bisporus* var. *Bisporus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 93, p. 35-45, 2016.

SOUILEM, F. et al. Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. **Food Chem.**, v. 230, p. 40-48, 2017.

SOUSA, J.M.S. Análise de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos aquosos de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil. **Dissertação**, p. 117, 2012.

SOUZA, R.A.T. et al. Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 451-457, 2016.

STAJIC, M. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzym. Microb. Technol.**, v.38, p. 65-73, 2006.

STEINDORFF, A.S. Genômica estrutural e funcional de fungos do gênero *Trichoderma*. Tese de Doutorado, p. 96, 2016.

SUN, L. et al. Comparison of free total amino acid compositions and their functional classifications in 13 wild edible mushrooms. **Molecules**, v. 22, p. 1-10, 2017.

SUN, Y. et al. Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 323-330, 2017.

TAMBEKAR, D.H. et al. The novel antibacterial from two edible mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor-caju*. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 5, p. 584-587, 2006.

TANAKA, A. et al. Enhancement of the Th1-phenotype immune system by the intake of Oyster mushroom (Tamogitake) extract in a double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, p. 1-7, 2015.

TATUSOV, R.L. et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes[J]. **BMC bioinformatics**, v. 4, n.1, p. 41, 2003.

TEIXEIRA, M.F.S. et al. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas). Manaus: Edua. 2011.

TEIXEIRA, M.M. et al. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-22, 2014.

The Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D1049-D1056, 2015.

TOMARAS, A.P.; DUNMAN, P.M. In the midst of the antimicrobial discovery conundrum: an overview. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p.103-107, 2015.

TZELEPIS, G. et al. Identifying glycoside hydrolase family 18 genes in the mycoparasitic fungal species *Clonostachys rosea*. **Microbiology**, v.161, p 1407-1419, 2015.

ULZURRUM, G.V.D. et al. Genomic analyses of two Italian oyster mushroom *Pleurotus pulmonarius* strains. **G3 Genes Genomes Genetics**, v. 11, n. 2, p. 1-7, 2020.

VALVERDE, M.E. et al. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VELIOGLU, Y.S. et al. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113–4117, 1998.

VENTURELLA, G. Medicinal mushrooms: bioactive compounds, use, and clinical trials. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 2, p. 634, 2021.

VETVICKA, V. et al. Immune-modulating activities of glucans extracted from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Functional Foods**, v. 54, p. 81-91, 2019.

VILLARES, A. et al. Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. **Agriculture**, v. 2, n. 4, p. 452-471, 2012.

VLASENKO, V. A. et al. Antiviral activity of total polysaccharide fraction of water and ethanol extracts of *Pleurotus pulmonarius* against the influenza A vírus. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v.10, n. 1, p. 224-235, 2020.

WANG, H.; NG, T.B. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Peptides**, v. 25, n. 1, p. 1-5, 2004.

WANG, J. et al. Antihyperglycemic activity of exopolysaccharide produced by mushroom *Pleurotus ferulae* with submerged liquid culture on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 7, p. 419-424, 2014.

WANG, W.H. et al. Antitumor Effect of By-1 from Spent Broth from Submerged Cultures of Stout Camphor Medicinal Mushroom, *Taiwanofungus camphoratus* (Higher Basidiomycetes), on A549 Adenocarcinoma Cells. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 19, n. 3, p. 225-232, 2017.

WANG, Y. et al. Integrated analysis of lncRNA-associated ceRNA network identified potential regulatory interactions in osteosarcoma. **Genetics and Molecular Biology**, v.43, n. 2, p. 1-10, 2020.

WATERHOUSE, R.M. et al. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. **Mol. Biol. Evol.**, v. 35, p. 543-548, 2018.

WEI, C. et al. *De novo* transcriptome assembly of *Ipomoea nil* using Illumina sequencing for gene discovery and SSR marker identification. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, p. 1873-1884, 2015.

WESENBERG, D. et al. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Adv.**, v. 22, p.161-187, 2003.

WHITE, T.J. et al. PCR protocols: a guide to methods and application. **Academic Press**, v. 19, n. 1, p. 315-322, 1990.

WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

XIE, C. et al. Comparative transcriptomics of *Pleurotus eryngii* reveals blue-light regulation of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) expression at primordium differentiated into fruiting body stage. **Genomics**, v.110, n. 3, p. 201-209, 2018.

YADAV, S.K. et al. A Mechanistic Review on Medicinal Mushrooms-Derived Bioactive Compounds: Potential Mycotherapy Candidates for Alleviating Neurological Disorders. **Planta Medica**, v. 86, n.16, p.1161-1175, 2020.

YAHIA, E. M. et al. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 226, p. 14–22, 2017.

YANG, Q.I. et al. Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1224-1228, 2012.

YAP, H.Y.Y. The genome of the Tiger Milk mushroom, *Lignosus rhinocerotis*, provides insights into the genetic basis of its medicinal properties. **BMC Genomics**, v. 15, p. 635, 2014.

YU, J.N. et al. Fast and cost-effective mining of microsatellite markers using NGS technology: An example of a Korean water deer *hydropotes inermis argyropus*. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2011.

YU, F. et al. Whole genome sequencing and genome annotation of the wild edible mushroom, *Russula griseocarnosa*. **Genomics**, v. 112, n. 1, p. 603-614, 2019.

YUAN, Y. et al. Whole genome sequence of *Auricularia heimuer* (basidiomycota, fungi), the third most important cultivated mushroom worldwide. **Genomics**, v. 111, p. 50-58, 2019.

ZAIDMAN, B. et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 453-468, 2005.

ZDOBNOV, E.M. et al. OrthoDB v9.1: cataloging evolutionary and functional annotations for animal, fungal, plant, archaeal, bacterial and viral orthologs. **Nucleic Acids Res.**, v. 45, p. D744-D749, 2017.

ZHANG, L. et al. Hepatoprotective effects of *Pleurotus ostreatus* protein Hydrolysates yielded by pepsin hydrolysis. **Catalysts**, v. 10, n. 6, p. 595, 2020.

ZHAO, D. et al. Immunomodulatory effects of edible and medicinal mushrooms and their bioactive immunoregulatory products. **J. Fungi**, v. 6, n. 4, p. 269, 2020.

ZHOU, R. et al. Research progres of bioactive proteins from the edible and medicinal mushrooms. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 20, p. 196-219, 2019.

ZIELINSKI, A.A.F. et al. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC-DAD-Q-TOF-MS/MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 897-907, 2016.

ZOU, Y. et al. Evaluation of korshinsk peashrub (*Caragana korshinskii* Kom.) as a substrate for the cultivation of *Pleurotus eryngii*. **Waste Biomass Valori.**, v.10, p. 2879-2885, 2018.

## 7 APÊNDICE

Artigo publicado:

Suelen Dias da Silva, Eliane Carvalho dos Santos, Waldeyr Mendes Cordeiro, Alessandra Alves da Silva Magalhães, Elliza Emily Perrone Barbosa, Maria Francisca Simas Teixeira, José Odair Pereira, Adolfo José da Mota. **Draft Genome Sequence of the Mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720.** Microbiology Resource Announcements, v. 10, n. 4 p. e00840-20. DOI: 10.1128/MRA.00840-20.