



2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Artrópodes como vetores de dispersão de espécies fúngicas – caso de estudo no Arquivo da Universidade de Coimbra

Artrópodes como vetores de dispersão de espécies fúngicas – caso de estudo no Arquivo da Universidade de Coimbra

João Trovão Lima

João Trovão Lima

2012

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Departamento de Ciências da Vida

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, área de especialização em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Manuel Santos Carriço Portugal (Universidade de Coimbra).

João Trovão Lima

2012

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas ...
Que já têm a forma do nosso corpo ...
E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos
mesmos lugares ...*

*É o tempo da travessia ...
E se não ousarmos fazê-la ...
Teremos ficado ... para sempre ...
À margem de nós mesmos...”*

Fernando Pessoa
(1888-1935)

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, ao Departamento de Ciências da Vida e ao Centro de Ecologia Funcional pelas condições que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Doutor António Portugal, pela oportunidade de realização deste trabalho, disponibilidade, preocupação, incentivo, confiança, amizade e importante transmissão de conhecimentos a quem fico eternamente grato.

À Dra. Ana Maria Bandeira e à Directora do AUC, Prof. Maria José Azevedo Santos, pela colocação do Arquivo da Universidade de Coimbra ao meu dispor, o que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Jorge Canhoto, Coordenador do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade e pelo apoio.

À Prof. Doutora Helena Freitas, Coordenadora do CFE, pela possibilidade de ter feito este trabalho de investigação.

Ao Nuno Mesquita e à Sandra Videira, meus colegas de trabalho e amigos, pela sua paciência, transmissão de conhecimentos, pelo apoio na minha adaptação laboratorial e por me despertarem o interesse pelos fungos.

À Diana Paiva e ao Ludgero Avelar, amigos e colegas de trabalho por toda a ajuda, amizade, incentivo e paciência.

Ao meu amigo e colega, Hugo Paiva de Carvalho, pela grande amizade, companheirismo, apoio científico e laboratorial e por todas as Valsas tristes tocadas num qualquer sítio da Lusa Atenas.

Ao Marco Cunha, André Nunes, Maurício Nunes, Ricardo Pinto, Adriano Miranda e aos Quilhoados por toda a amizade, companheirismo, irmandade e apoio ao longo de todos estes anos.

À minha mãe, à minha Avó e ao meu Tio, por me terem proporcionado uma óptima educação e assimilação de valores e por todo o esforço, dedicação, carinho, incentivo e paciência que me permitiram chegar onde estou hoje.

Por fim gostaria de dedicar este trabalho, a duas pessoas que terei no meu pensamento para o resto da minha vida, ao meu Avô Artur Carvalho Lima e a minha amiga Filomena Murteira.

Lista de Abreviaturas

A - Adenina

A - Ampère

AFLP - Amplification Fragment Length Polymorphism

AUC - Arquivo da Universidade de Coimbra

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

C - Citosina

CAPS - Cleaved Amplified Polymorphic Site

CFE - Centro de Ecologia Funcional

cm – centímetro

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ETS- E-Twenty Six domain

FCTUC - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Fig. - Figura

g - gramas

G - Guanina

IGS - Intergenic Spacer

ITS - Internal Transcribed Spacer

Km - Kilómetro

L - Litro

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

ml - mililitro

mM - miliMolar

MO - Microscópio Óptico

N.I. - Não identificado

NCBI - National Center for Biotechnology Information

°C - graus Celcius

p.e. – por exemplo

pb - pares de base

PCR - Polimerase Chain Reaction

PDA - Potato Dextrose Agar

rDNA - ADN ribossomal

RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA

rRNA - RNA ribossomal

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA - Ácido ribonucleico

SNP - Single Nucleotide Polymorphisms

sp. - Espécie

SSR - Simple Sequence Repeats

T - Timina

TA - Temperatura de Annealing

TBE - Tris-Borato-EDTA

UC - Universidade de Coimbra

UV - Ultra Violeta

V - Volt

µl - Microlitro

% - Percentagem

[#] - Referência bibliográfica online

Resumo

Insectos e outros organismos do filo arthropoda são responsáveis pela dispersão de esporos de diferentes grupos de fungos, como por exemplo os ascomicetes, os basidiomicetes e os fungos imperfeitos. Os objectivos deste estudo foram avaliar o papel de artrópodes como dispersores de fungos e potenciais vectores de contaminação entre documentos do Arquivo da Universidade de Coimbra, estudar os efeitos da sazonalidade na diversidade de espécies fúngicas que estão associados aos invertebrados deste local e compreender a relação entre a diversidade de fungos e os diferentes taxa de artrópodes colhidos.

Um trabalho anterior com obras deste Arquivo descreveu uma elevada diversidade de fungos colonizando diferentes documentos, feitos de diversos substratos tais como pergaminho, papel-vergê e pasta de papel. *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. foram as espécies identificadas como dominantes em documentos nos quais processos de biodegradação eram visíveis. Embora estas espécies sejam ubíquas, podendo facilmente dispersar através de mecanismos anemófilos, outro trabalho (dados não publicados) revelou uma baixa diversidade de fungos no ar do Arquivo, sugerindo que outras formas de dispersão complementares podem também ter relevância neste local. A presença de insectos e outros artrópodes que circulam livremente através do Arquivo, sugere que a dispersão zoocórica poderá desempenhar um papel importante na dispersão de espécies de fungos entre documentos distintos.

A sequenciação total da região ITS, combinada com uma análise de características taxonómicas macroscópicas e microscópicas, forneceu dados sobre as espécies fúngicas associadas aos artrópodes e permitiu uma avaliação da diversidade de fungos no AUC. Os resultados mostram uma elevada diversidade associada aos artrópodes: de um total de mais de 152 isolados, 25 géneros e 59 espécies de fungos, foram identificados e mantidos em cultura. Os géneros predominantes foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*.

Avaliar a relação entre a diversidade de fungos encontrada colonizando documentos, as espécies encontradas na análise do ar, e as espécies associadas a artrópodes, poderá fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos de dispersão de fungos em arquivos, bibliotecas e afins. Convém realçar que esta informação é importante no desenvolvimento de estratégias seguras com a finalidade de prevenção de contaminação de documentos e sua consequente biodegradação.

Palavras chave: Dispersão de fungos por vectores; Coleções históricas; Região ITS;
Fungos entomopatogénicos;

Abstract

Insects and other arthropods are responsible for spore dispersion in species belonging to different fungal groups, such as the ascomycetes, basidiomycetes, zygomycetes and imperfect fungi. The aims of this study were to evaluate the role of arthropods as fungal dispersers and potential vectors of contamination between the documents from the Archive of the University of Coimbra; to study the effects of seasonality in the diversity of fungal species that are associated with the invertebrates caught; and to better understand the relation between the fungal diversity and the different arthropod *taxa*.

A previous work with documents from this Archive described a high fungal diversity, colonizing different documents, made of several substrates, such as parchment, laid-paper and wood-pulp paper. *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. were the most common species, from those found in documents where biodegradation was visible. Although these species are ubiquitous and can easily disperse through anemophilous mechanisms, another work (unpublished data) revealed a low fungal diversity in the air of the Archive, which suggests that other forms of dispersion may also be relevant. The presence of insects and other arthropods circulating through the Archive suggested that zoochoric dispersion could play a significant role in the dispersion of fungal species between documents.

The sequencing of the total ITS region, combined with a analysis of macroscopic and microscopical taxonomic traits, provided data on the species carried by arthropods and allowed us to assess the fungal diversity. Results show a high fungal diversity associated with invertebrates: from a total of over 152 isolates, 25 fungal genera and 59 species, were identified and kept in culture. The most common genera were *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium*.

Assessing the relation between the diversity that was found colonizing documents, in the air analysis, and associated with insects, will provide us with a better understanding of the mechanisms of fungal dispersion in archives, libraries and alike. This information is also valuable when developing safe ways to prevent document contamination and its consequent biodegradation.

Keywords: Fungal Vektored dispersion; Heritage collections; ITS sequencing;
Entomopathogenic fungi;

Índice

Agradecimentos	4
Lista de abreviaturas	5
Resumo	7
Abstract.....	9
Capítulo I – Introdução	15
1.1 - Fungos como agentes de biodeterioração do património cultural	16
1.1-1 O Arquivo da Universidade de Coimbra	16
1.1.2 Biodeterioração de colecções de património cultural por espécies fúngicas	18
1.1.3 Diversidade fúngica em documentos do Arquivo da Universidade de Coimbra.....	23
1.1.4 Mecanismos de dispersão de propágulos fúngicos	24
1.2 - Marcadores moleculares em espécies fúngicas	28
1.2.1 Marcadores moleculares.....	28
1.2.2 Região ITS.....	29
1.3 - Objectivos.....	31
Capítulo II – Materiais e métodos.....	32
2.1 - Locais e métodos de amostragem.....	33
2.2 - Colheita de artrópodes	33
2.3 - Preparação das amostras	34
2.4 - Isolamento	35
2.5 Identificação e análise da região ITS	35
2.5.1 Extracção de DNA	35
2.5.2 PCR e electroferese em gel de agarose	36
2.5.3 Sequenciação e BLAST	37

2.5.4 Identificação morfológica	38
2.6 - Análise estatística	38
Capítulo III – Resultados	40
3.1 - Identificação molecular e morfológica	41
3.2 - Diversidade fúngica associada a artrópodes	42
3.3 - Análise estatística	51
Capítulo IV – Discussão	53
Capítulo V – Conclusões e perspectivas futuras	58
Capítulo VI – Bibliografia	60
6.1 - Referências Bibliográficas	61
6.2 - Referências Online	68

Índice de Figuras

Figura 1 - Mapa da zona alta de Coimbra, indicando a localização do AUC.....	16
Figura 2 - Pormenores do Arquivo da Universidade de Coimbra. (A) Fachada do AUC, (B) Estantes com parte da documentação mantida no AUC.....	17
Figura 3 - Colónias de fungos contaminantes visíveis em quadros (A) e em livros (B).	20
Figura 4 - Mecanismos de formação das melanoidinas responsáveis pelo processo de “foxing”	22
Figura 5 - Matriz repetitiva do rDNA com as regiões ITS1, 5.8S e ITS2.	30
Figura 6 - (A) Armadilha de base colante utilizada para a captura de artrópodes (B) Localização da superfície colante.	33
Figura 7 - Pormenor de um invertebrado, após colheita.	34
Figura 8 - (A) Processo de maceração. (B) Homogenizador utilizado para a maceração dos invertebrados colhidos.....	34
Figura 9 - Meios de cultura a secar numa câmara de fluxo laminar.	35
Figura 10 - Extractor semi-automático <i>ABI Prism 6100™ PrepStation</i>	36
Figura 11 - (A) Eppendorfs com os produtos de PCR. (B) Poços de um gel de agarose carregados.	37
Figura 12 - Fotografia de um gel de agarose corado com GelRed (Biotium, USA), sob radiação UV demonstrando a amplificação total da região ITS por PCR utilizando os primers ITS1-F e ITS4 para vários isolado.(M - marcador molecular (HyperLadder))..	41
Figura 13 - (A1) Morfologia de uma colónia de <i>Cladosporium</i> sp.; (A2) conidióforos e cadeias de conídios de <i>Cladosporium</i> sp. visualizados ao MO 400x; (B1) Morfologia de uma colónia de <i>Aspergillus</i> sp.; (B2) cabeça de conídios de <i>Aspergillus</i> sp. visualizada ao MO 1000x; (C1) Morfologia de uma colónia de <i>Penicillium</i> sp.; (C2) conidióforos e conídios de <i>Penicillium</i> sp. visualizados ao MO 400x;	42
Figura 14 - Número de espécies isoladas em cada género.....	51
Figura 15 - Número de isolados de cada espécie de fungo.....	52

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tabela resumo das frequências de isolados em documentos de diversos suportes. (sp.- Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular.)	23
Tabela 2 - Sequências dos <i>primers</i> específicos para amplificação total da região ITS do ADN ribossomal (ITS4 corresponde ao <i>primer</i> reverso).....	37
Tabela 3 - Identificação dos isolados fúngicos obtidos após isolamento em PDA, por armadilha, local, estação do ano, colheita, e ordem do artrópode capturado. (N.I.- Não identificado, sp.- Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular.).....	41
Tabela 4 - Correspondência entre o número de isolados fúngicos e a ordem do artrópode correspondente do qual foi isolado. (N.I.- Refere-se a 1ª colheita na qual os invertebrados não foram identificados, sp.- Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular.....	47
Tabela 5 - Tabela de correlação entre o número de isolados fúngicos e a estação do ano na qual foram colhidos. (N.I.- Não identificado, sp.- Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular.).....	49
Tabela 6 - Índices de diversidade fúngica por pisos do Arquivo.....	52
Tabela 7 - Índices de diversidade fúngica correspondentes à análise por ordem de artrópode.	52
Tabela 8 - Índices de diversidade fúngica correspondentes à análise por estação do ano.	52

Capítulo I – Introdução

1.1 - Fungos como agentes de biodeterioração do património cultural

1.1-1 - O Arquivo da Universidade de Coimbra

No panorama nacional, apenas a Universidade de Coimbra e a Universidade do Minho possuem um Arquivo de documentação próprio. Este panorama repete-se a nível internacional sendo escassas as Universidades que possuem estruturas similares, com a função de arquivo da sua documentação ao longo da história.

Desde a fundação da Universidade de Coimbra em 1 de Março de 1290, o Arquivo da Universidade de Coimbra, representa o local de armazenamento de toda a documentação produzida e recebida nesta instituição, bem como, de todos os documentos relativos ao Arquivo distrital a si agregado no início do século XX, o que inerentemente reflecte de uma forma peculiar e única a história da Universidade (Vasconcelos 1991). Até à data, o Arquivo da Universidade de Coimbra é o único a nível nacional, para o qual foram construídas instalações próprias para o seu efeito em 1948 (Figura 1). A partir de 1965 passa a constituir um estabelecimento anexo à reitoria, sendo o seu director escolhido de entre três professores da Universidade indicados pelo Senado.



Figura 1 - Mapa da zona alta de Coimbra, indicando a localização do AUC.

O Arquivo da Universidade de Coimbra (Figura 2A) alberga assim um significativo espólio (Figura 2B), com elevado valor cultural e histórico, englobando nas suas colecções documentos de valor incalculável tais como o documento da fundação da própria Universidade de Coimbra, os estatutos de D. Manuel de 1502, os estatutos Pombalinos de 1772 e diversos documentos com séculos de história pertencentes a diferentes Colegiadas, de onde se destaca o documento mais antigo guardado no Arquivo, datado de 983, pertencendo à Colegiada de Guimarães [1].

São da responsabilidade do Arquivo, conforme indicado pelo Artigo nº 27 dos estatutos da Universidade de Coimbra, a preservação, o enriquecimento e o tratamento técnico do património arquivístico da Universidade e das instituições do distrito de Coimbra, o apoio à investigação na Universidade e na comunidade, bem como o desenvolvimento de actividade cultural e editorial própria [2].

Tratando-se de um edifício moderno, construído na década de 40, um diversificado tipo de materiais foram empregues na sua construção. Esta diversidade de materiais aliada a uma vasta colecção de documentos feitos de diferentes tipos de suportes, com vários séculos de história, aumenta significativamente a possibilidade de formação de nichos ecológicos com condições nutricionais e de temperatura adequadas, para que interacções entre microorganismos e o seu desenvolvimento possam ocorrer (Gravesen *et al.* 1999; Hyvarinen *et al.* 2002).

A acumulação de poeiras, fragmentos de fungos e bactérias mortas, metabolitos de bactérias autótroficas e fezes de animais aliados a uma excessiva humidade estabelecem nichos ecológicos que podem ser ocupados por agentes de biodeterioração (Schabereiter-Gurtner *et al.* 2001).

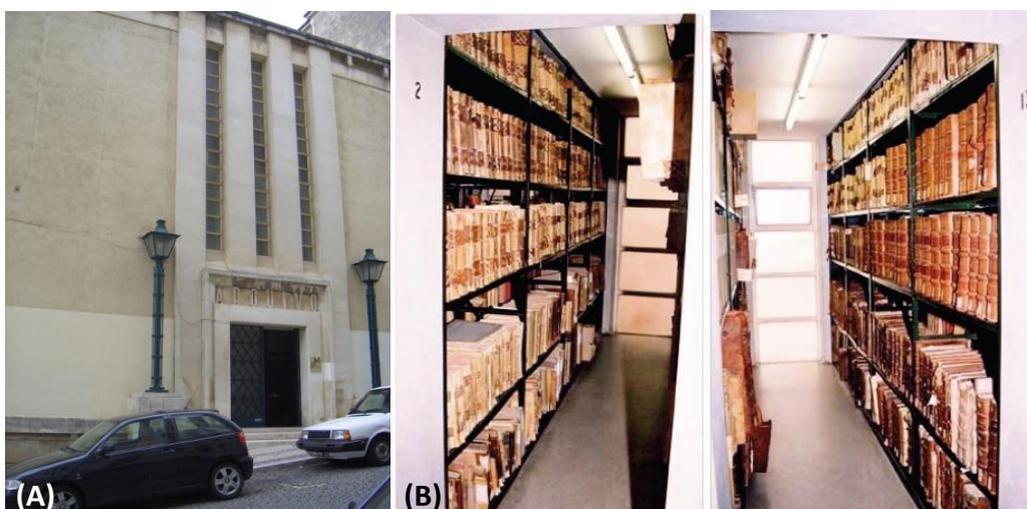


Figura 2 - Pormenores do Arquivo da Universidade de Coimbra. (A) Fachada do AUC, (B) Estantes com parte da documentação mantida no AUC.

Contudo, o facto dos materiais de construção utilizados poderem providenciar substratos para a colonização de microrganismos, outras condições como a capacidade de crescimento no suporte em causa, a disponibilidade de nutrientes, pH, porosidade, humidade e capacidade de dispersão pelas espécies devem ser tidas em conta uma vez que são factores limitantes na ocupação de nichos ecológicos simples (Grant *et al.* 1989; Hyvarinen *et al.* 2002).

Pela grande colecção de documentos e pelas condições de preservação e conservação de algumas das colecções albergadas neste Arquivo nem sempre terem sido as mais adequadas, alguns dos documentos armazenados neste local encontram-se susceptíveis a biodegradação e biodeterioração por microrganismos (Mesquita *et al.* 2009).

1.1.2 Biodeterioração de colecções de património cultural por espécies fúngicas

Os organismos pertencentes ao reino Fungi são organismos eucarióticos capazes de produzir diversificados tipos de enzimas e metabolitos, desempenhando por isso, um papel fulcral na decomposição da matéria orgânica e conseqüentemente contribuindo activamente para o ciclo dos nutrientes (Deacon 2006).

Para além da sua inequívoca importância nos ecossistemas, desempenham ainda um papel importante na cultura e vida humana e no seu desenvolvimento social e cultural. Serviram de alimento para as populações desde o início da humanidade, foram mais tarde utilizados na produção da cerveja e do pão, no descobrimento do primeiro antibiótico e hoje em dia nas crescentes estratégias de biorremediação empregues na recuperação de áreas sujeitas a problemas de ordem ambiental (Wainwright 2008).

Embora algumas das suas características tenham sido empregues com vista ao benefício das populações humanas, outras podem levar à perda de património histórico importante, através dos fenómenos da biodeterioração e biodegradação (Sterflinger 2010).

As diversificadas capacidades enzimáticas destes organismos possibilitam-lhes uma fácil colonização de novos substratos, tendo já sido descritos em tintas, óleos, papel, couro, têxteis, adesivos, bem como outros materiais utilizados na produção de objectos com valor cultural, artístico e histórico (Jurado *et al.* 2008).

A natureza química e estrutural do substrato, bem como condições ambientais tais como a humidade, a temperatura, o pH e a luz, são parâmetros significativos que

afectam a colonização microbiana de obras de arte (Opela 1992; Saiz-Jimenez 1993). Contudo factores como a fonte de celulose (linho, algodão, polpa de madeira), revestimentos (amido, adesivos sintéticos e naturais), compostos inorgânicos (carbonatos, sulfatos, argila) e contaminantes (metais pesados) desempenham também um papel importante no ataque de fungos ao suporte em causa (Abrusci *et al.* 2005; Pinzari *et al.* 2006).

A facilidade de colonização de novos substratos aliada à presença de nichos ecológicos rudimentares em arquivos, livrarias e museus em todo o mundo, resulta na colonização e consequente biodeterioração das suas obras por microorganismos (Fabbri *et al.* 1997).

Uma das problemáticas mais frequente em locais de armazenamento de obras históricas trata-se da degradação dos componentes do papel. A degradação do papel deve-se sobretudo a três factores: ao processo químico de oxidação, à incidência de luz UV e à condensação de humidade.

A oxidação da celulose pela interacção com moléculas de oxigénio atmosférico pode resultar na formação de radicais de peróxido de hidrogénio e na formação de ligações duplas conjugadas que alteram a estrutura da celulose.

Pelo seu lado a luz UV pode agir como catalisador para a degradação do papel através da formação de ligações duplas conjugadas, que provocam a interrupção das cadeias de celulose.

Por fim a condensação da humidade pode causar alterações físico-químicas no papel, uma vez que estas áreas geralmente apresentam condições óptimas para o desenvolvimento de microrganismos colonizadores (Arai 2000).

Em adição a este processo natural de degradação da celulose, quando presentes em materiais celulósicos, os fungos são capazes de produzir alterações cromáticas, como manchas de diferentes cores, tonalidades e texturas, que resultam do crescimento do micélio e da produção de pigmentos (Montemartini Corte *et al.* 2003; Borrego *et al.* 2008). Coincidindo com o seu crescimento, ocorre também a produção de enzimas que degradam materiais, afectando substancialmente os substratos pela degradação de aglutinantes orgânicos, o que resulta na redução ou mesmo na eliminação de camadas de tinta permitindo a penetração do micélio e o seu crescimento em falhas, causando o seu destacamento (Sterflinger 2010).

Quando presentes em papel, são capazes de degradar componentes de carbono como a celulose, e excretam ácidos orgânicos, tais como o ácido oxálico, o ácido fumárico, o ácido succínico e o ácido acético, que pelo contacto com o substrato o

acidificam. Este ataque às fibras de celulose para além de provocar uma alteração cromática, acaba também por provocar danos químicos e estruturais muitas vezes irreversíveis (Hidalgo & Borrego 2006).

Comparativamente, as bactérias necessitam de condições de maior humidade, tendo por isso um papel mais limitado do que os fungos na biodeterioração de documentos presentes em arquivos e bibliotecas (Guimet & Gómez de Saraiva 2007; Borrego *et al.* 2006).

Um exemplo recorrente, causado por fungos em diversos suportes, é o fenómeno denominado por “foxing” (Arai 2000). Este fenómeno baseia-se nas alterações físicas frequentemente encontradas em documentos, mas também em quadros, murais, esculturas, vitrais e filmes cinematográficos (Figura 3), na forma de manchas acastanhadas/avermelhadas que resultam de uma alteração da estética e das propriedades físico-químicas do suporte em causa (Montemartini Corte *et al.* 2003; Piñar *et al.* 2009)



Figura 3 – Colónias de fungos contaminantes visíveis em quadros (A) e em livros (B) (Sterflinger 2010).

Estas alterações cromáticas são consideradas um problema grave na conservação de documentos, uma vez que podem migrar através de páginas sucessivas causando danos irreversíveis que a longo prazo podem prejudicar a legibilidade do documento. Associado ao crescimento do micélio, ocorre um aumento do número de áreas manchadas o que se traduz numa degradação mais severa (Arai 2000; Rakotonirainy *et al.* 2007).

Contudo, estas alterações cromáticas não resultam exclusivamente de uma actividade fúngica (Meynell & Newsam 1978). Tradicionalmente, são enumerados três processos distintos para que o “foxing” ocorra: a oxidação directa de metais pesados e a consequente migração de produtos de degradação solúveis a partir do centro metálico, o aumento da humidade relativa que provoca o aumento da reactividade química e a consequente auto-oxidação da celulose e por fim a deposição de metais pesados aliado à

colonização por fungos produzindo a acidificação da celulose e conseqüentemente um efeito deletário.

Duas teorias complementares tentam postular uma explicação consenso para este fenómeno: a teoria biótica enuncia que estas manchas resultam da presença e actividade de microrganismos colonizadores, enquanto que a teoria abiótica enuncia fenómenos químicos como a deposição de materiais pesados e a sua posterior oxidação para a explicação deste processo degradativo (Meynell & Newsam 1978; Arai 2000).

O isolamento de espécies fúngicas em conjunto com a análise e caracterização de diversos componentes químicos de natureza orgânica (ácido fumárico, ácido málico, ácido láctico, glicose, celobiose, derivados da celulose, ácido aminobutírico, ácido aspartático, ácido glutâmico, e os aminoácidos glicina e serina) nestes suportes evidenciam no entanto, uma forte argumentação da teoria biótica.

Actualmente, o mecanismo mais aceite pelo qual este fenómeno ocorre está descrito pelo processo representado na Figura 4: a dispersão de conídios ou ascósporos ocorre, o que leva a que estes adiram a todos os tipos de materiais adjacentes. Os conídios ou os ascósporos, de um modo geral, necessitam apenas de alguma humidade para germinar, ocorrendo o crescimento do micélio e a formação de colónias que circulam partículas de poeira, produzindo ácido málico, ácido aminobutírico e outros aminoácidos como produtos do seu metabolismo. As condições óptimas para a ocorrência deste processo variam de espécie para espécie, mas de um modo geral, encontram-se entre uma percentagem de 75-84% de humidade relativa e 20 a 30°C de temperatura. Simultaneamente, ocorre a libertação de ácidos orgânicos e metabolitos, que promovem a degradação da celulose e o conseqüente aparecimento de celuloso-oligosacarídeos. Estes compostos reagem entre si pela reacção de Maillard e acabam por dar origem a melanoidinas que produzem a alteração cromática conhecida por “foxing” (Arai 2000).

As espécies fúngicas desempenham assim um papel activo na deterioração do nosso património cultural. Uma das principais razões que as coloca num papel de relevo como uma problemática para conservação do património cultural trata-se da falta de informação e da parca formação de restauradores, curadores e outros profissionais de museus nos tópicos de taxonomia e ecologia de fungos, aliada a uma, por vezes, incompleta aplicação de medidas de prevenção de contaminação que abrangem desde o controlo das condições climáticas, à limpeza frequente e à monitorização visual destes fenómenos. O incompleto conhecimento dos agentes de deterioração, aliado à

dificuldade de detecção destes organismos colonizadores, dificulta os processos de identificação, restauro e manutenção das obras (Michaelson *et al.* 2006).

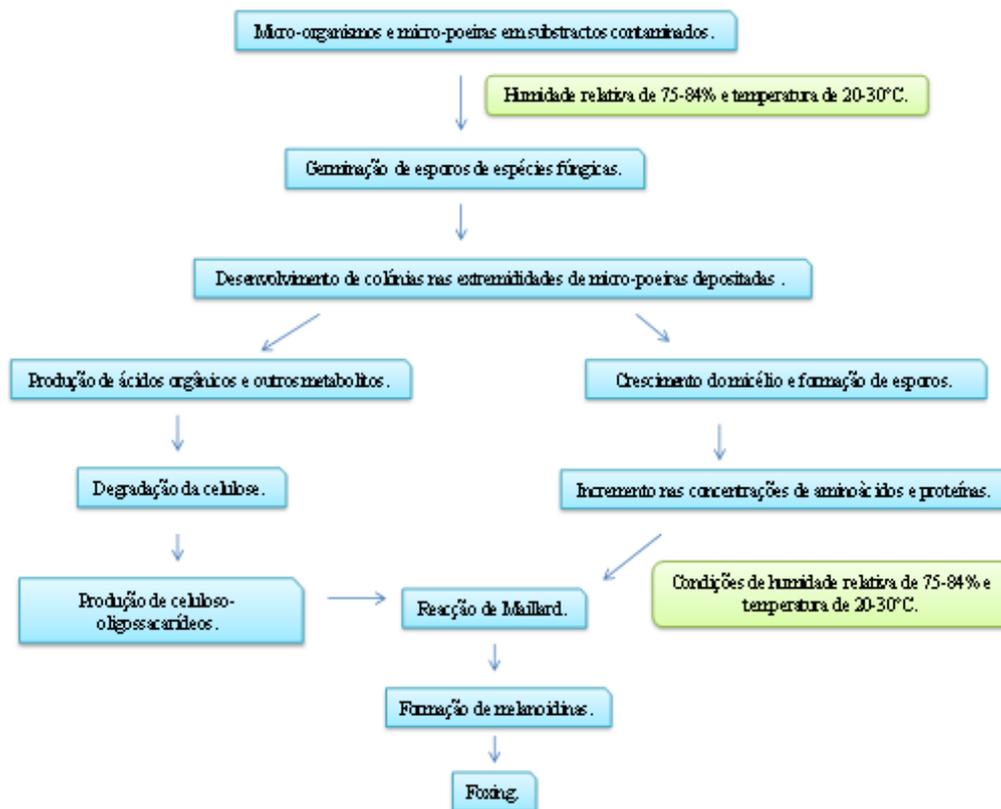


Figura 4 - Mecanismos de formação das melanoidinas responsáveis pelo processo de “foxing” (Adaptado de Arai 2000).

Muitas espécies de fungos isoladas são ubíquas e pertencem ao grupo dos ascomicetes normalmente abundantes no ar e no solo (Zyska 1997). A presença de espécies cosmopolitas torna a identificação numa questão complexa, uma vez que estas espécies apresentam um padrão de comportamento biológico variável sendo que tanto podem apresentar uma enorme actividade celulolítica, como também podem facilmente optar por outros substratos mais ou menos complexos (Arai 2000; Szczepanowska & Cavaliere 2000).

Questões de saúde pública são também motivo de preocupação uma vez que a maioria das espécies contaminantes é capaz de produzir micotoxinas potencialmente patogénicas para o ser humano.

O crescimento e desenvolvimento de fungos em hospedeiros humanos (quer sejam patógenos primários ou oportunistas) resulta no conjunto de doenças vulgarmente

designadas por micoses, enquanto que a exposição alimentar, dérmica ou respiratória a metabolitos tóxicos resultam em micotoxicoses que podem causar vários tipos de enfermidades para aqueles que lidam com o manuseamento de colecções históricas (Bennet & Kilch, 2003). De facto, muitas espécies toxicogénicas presentes nas correntes de ar em edifícios sobre a forma de esporos, fragmentos de hifas ou poeiras contaminadas estão directamente ligadas a efeitos adversos à saúde (Jarvis 2002).

1.1.3 Diversidade fúngica em documentos do Arquivo da Universidade de Coimbra

Em 2009, Mesquita *et al.* descreveram uma alta diversidade de fungos colonizando diferentes tipos de papel e pergaminho armazenados no Arquivo da Universidade de Coimbra. Uma elevada frequência de espécies pertencentes aos géneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* foi identificada por métodos moleculares e morfológicos, e posteriormente mantida em cultura (Tabela 1).

Tabela 1 - Tabela resumo das frequências de isolados em documentos de diversos suportes. (*sp.*- Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular.) (Adaptado de Mesquita *et al.* 2009)

Espécies	Suporte		
	Pergaminho	Papel vergé	Pasta de Papel
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	1	2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	2	1
<i>Chaetomium globosum</i>	2	1	0
<i>Chromelosporium carneum</i>	1	2	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	2	0
<i>Alternaria alternata</i>	1	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	1	0
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	0	0
<i>Botrytis cinerea</i>	1	0	0
<i>Coprinus sp.</i>	1	0	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	0	1
<i>Penicillium canescens</i>	0	1	0
<i>Penicillium helicum</i>	1	0	0
<i>Penicillium sp.</i>	1	1	0
<i>Phlebia subserialis</i>	1	0	0
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	0	0	1
<i>Skeletocutis sp.</i>	1	0	0
<i>Thanatepharus cucumeris</i>	0	0	1
<i>Toxicladosporium irritans</i>	1	0	0

Os géneros acima enunciados são normalmente encontrados como contaminantes e agentes de biodeterioração em diversos habitats e tipos de materiais diferentes, podendo resultar em biodeterioração grave, incluindo alteração estética e degradação química e mecânica (Fabbri *et al.* 1997).

Os géneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são taxa ubíquos, que produzem numerosos conídios e mitosporos facilmente dispersos pelo ar (Abrusci *et al.* 2005), sugerindo mecanismos de dispersão anemófila como a principal forma de dispersão de propágulos fúngicos no Arquivo (Mesquita *et al.* 2009). De facto a disseminação por anemocoria é a principal forma de propagação para muitos fungos, contudo, contrariamente, estudos com amostragens de ar revelaram uma baixa diversidade de fungos associada com o ar deste local (dados não publicados). A baixa diversidade encontrada durante a análise do ar permite a consideração de outros mecanismos complementares para a dispersão de propágulos neste local, uma vez que os fungos podem utilizar outras formas de dispersão como a hidrocoria e a zoocoria (Abbot 2002).

1.1.4 Mecanismos de dispersão de propágulos fúngicos

Os fungos tal como as plantas são organismos sésseis, não podendo deslocar-se para novos habitats. Esta incapacidade de mobilidade resulta obrigatoriamente em duas formas de expansão: o crescimento pode ocorrer numa área adjacente, ou pela dispersão de propágulos para além dos limites físicos dos seus progenitores (Deacon 2005).

Os esporos são os propágulos reprodutores dos fungos, que apresentando tipos e formas heterogéneas de dispersão, foram fulcrais para o sucesso evolutivo das diferentes espécies. Adaptações morfológicas em grupos semelhantes resultam de forças co-evolucionárias paralelas, revelando uma alta complexidade na disseminação destes organismos (Abbot 2002; Deacon 2005).

Comparativamente às plantas, os esporos de espécies fúngicas são geralmente mais leves, o que lhes permitem ultrapassar barreiras limite de dispersão quer pela ejeção mecânica quer pela utilização de vectores de dispersão como a água, o vento ou animais (Trail 2007). Assim, distinguem-se comumente dois mecanismos de dispersão de propágulos: mecanismos activos e mecanismos passivos [3;4].

Por exemplo, nos ascomicetes, mecanismos de dispersão activos estão geralmente relacionados com variações de pressão e mecanismos de ejeção. Os

mecanismos de ejeção resultam da absorção de água pelos ascos maduros, o que permite a solubilização de componentes celulares geralmente insolúveis levando a uma subida da pressão interna que ao tornar-se suficientemente alta, provoca a ruptura de um opérculo ou de um anel elástico do asco que rompe explosivamente ejetando os esporos (DeBary 1887). Pelo seu lado mecanismos de dispersão passivos estão relacionados com a utilização de vectores de dispersão englobando formas de dispersão anemocóricas, zoocóricas e hidrocóricas (Webster 1980).

A disseminação por anemocoria é a principal forma de dispersão para muitos ascomicetes e basidiomicetes. Através da ejeção dos corpos futíferos, os esporos podem ser dispersos por correntes de ar [6]. Este fenómeno deve-se em grande parte à facilidade com que os esporos desidratam e se tornam facilmente anemocóricos.

Deste modo, esporos desidratados, são facilmente dispersos pelo ar, enquanto que pelo seu lado esporos com capacidade de aderência ou flutuação, utilizam mecanismos de hidrocoria e de zoocoria (Abbot 2002; Holz *et al.* 2007).

Os fungos cujos habitats são ambientes aquáticos possuem esporos com formas invulgares e apêndices distintos que lhes permitem flutuar. A água pode auxiliar também na disseminação de esporos desidratados, pela acção de gotas de chuva ou pela formação de granizo que por impacto, rompem uma superfície de retenção, permitindo o deslocamento de propágulos para correntes de ar (Deacon 2005; Trail 2007).

A dispersão por insectos e outros artrópodes é também uma forma significativa de dispersão para muitas espécies fúngicas uma vez que os esporos podem aderir aos corpos dos artrópodes, quando estes se deslocam sobre substratos contaminados, podem ser transportados pela sua ingestão e posterior disseminação e inclusivé pelo desenvolvimento de espécies entomopatogénicas ou saprofítas (Abbot 2002; Dromph 2003; Jurado *et al.* 2008).

O filo Arthropoda é o maior filo de animais existente, tendo surgido há cerca de 600 milhões de anos no Pre câmbrico e passando por uma enorme radiação adaptativa desde essa altura, o que lhes conferiu uma grande diversidade de tamanhos, formas, cores e modos de locomoção permitindo-lhes ter sido o primeiro filo de animais a colonizar todas as biomas da terra. Aliada a esta enorme diversidade está subjacente uma grande importância ecológica e económica que se estende desde a polinização, à composição da base de cadeias alimentares para diversos grupos de animais, a produção de bens de consumo, até à indústria têxtil e à indústria farmacêutica (Brusca 2003).

Apesar dos inúmeros benefícios para os ecossistemas e para os seres humanos, algumas espécies deste grupo de invertebrados são consideradas pragas pelas

capacidades de transmissão de doenças e de provocar danos na agricultura. Adicionalmente podem impor risco para a saúde humana pela sua habilidade para propagarem agentes patogénicos, actuando como vectores de dispersão (Roxo *et al.* 2010).

A dispersão de esporos vectorizada por artrópodes é um mecanismo comum na propagação de muitas espécies de fungos. A relação fungo-animal é muitas vezes benéfica para ambos os parceiros, uma vez que o artrópode transporta o fungo para um novo substrato, enquanto que ao invertebrado é assegurado um local de reprodução (Basidiomycetes) ou uma fonte de nutrientes (Ascomycetes) (Schiestl *et al.* 2006).

Este mecanismo de dispersão pode inclusive, ser mais eficaz do que o vento ou a água, uma vez que recruta as capacidades locomotoras de invertebrados de modo a que a dispersão seja dirigida para ambientes ricos em nutrientes.

Na natureza, muitos fungos estão sujeitos a predação por artrópodes, devido à sua capacidade para acumular quantidades elevadas de azoto e fósforo (Ruess & Lussenhop 2005). Como resposta à falta de nutrientes, muitas espécies de fungos são capazes de diferenciar células em formas latentes (esporos), que são resistentes a vários tipos de tensões ambientais. Esta resistência é geralmente associada com a parede da célula, mais complexa do que a parede celular da maioria das plantas, o que permite a passagem através do tracto digestivo de artrópodes, mantendo ao mesmo tempo a sua viabilidade, e permitindo uma eficiente dispersão por invertebrados (Collucio *et al.* 2008).

Este comportamento biológico é muito semelhante à atracção e dispersão por polinizadores em plantas. Como tal muitas espécies fúngicas produzem metabolitos secundários com o intuito de atrair espécies de artrópodes, de forma a poderem ser dispersos por vias que utilizam vectores (Rohfls & Churchill 2011). Adicionalmente, mecanismos de dispersão por vectores actuam muitas vezes de forma a permitir o cruzamento entre tipos sexuais diferentes (Schiestl *et al.* 2006), possibilitando uma reprodução diferencial, mas também a dissolução de tetrádas de ascomycetes no aparelho digestivo, o que se traduz numa subida da taxa de esporos libertados e consequentemente da sua capacidade reprodutora (Baverstock *et al.* 2009).

A produção de propágulos fúngicos que são capazes de aderir a outros materiais contribui para a dispersão de propágulos para outros substratos (Holz *et al.* 2007), uma vez que podem aderir a depressões anatómicas do corpo de artrópodes, contribuindo para um transporte mais eficiente e a maiores distâncias das colónias originais. Neste caso os esporos encontram-se cobertos por um muco amorfo que facilita a adesão do esporo à cutícula do invertebrado. Comparativamente no caso de fungos com esporos

desidratados, esta adesão apesar de incomum ocorre pela acção de forças hidrofóbicas que contribuem fortemente para a adesão do esporo à cutícula do vector (Bouclas & Pendland 1988).

Espécies entomopatogénicas é a designação atribuída as espécies fúngicas que actuam como parasitas de artrópodes, podendo levar à sua morte ou a uma grande alteração dos seus padrões biológicos normais (Meyling *et al.* 2006; Jurado *et al.* 2008; Down *et al.* 2009). São caracterizadas por possuírem elevadas taxas de crescimento, capacidade de sobrevivência no interior do hospedeiro, resistindo às barreiras físico-químicas dos tegumentos e da hemolinfa e por fim por causarem uma morte rápida do hospedeiro.

De um modo geral, os esporos destas espécies, sobre a forma de conídios, aderem preferencialmente à cutícula do hospedeiro, que sobre condições ideais de humidade e temperatura germinam produzindo hifas que penetram a cutícula e posteriormente invadem o sistema circulatório do hospedeiro. Dentro do hospedeiro, células fúngicas (hifas ou micélio) multiplicam-se, levando à morte do artrópode pela produção de micotoxinas ocorrendo conseqüentemente a mumificação do cadáver.

Uma vez que muitos metabolitos secundários de fungos são tóxicos para os artrópodes antagonistas, a maquinaria biossintética de formação de micotoxinas pode ser mantida para fornecer escudos químicos contra os animais predadores.

O transporte de fungos entomopatogénicos pelo hospedeiro para outros hospedeiros susceptíveis é um dos mecanismos mais importantes para a transmissão para novos habitats uma vez que se trata de um mecanismo directo sujeito a menores taxas de mortalidade que a ejeção de conídios para um substrato adjacente (Fuxa & Tañada 1987), para além de que espécies entomopatogénicas podem ser transportadas a distâncias muito superiores visto que a infecção de insectos alados pode permitir uma dispersão até 1.600 km através do vôo em correntes de ar (Robert 1987; Baverstock *et al.* 2009).

1.2 Marcadores moleculares em espécies fúngicas

1.2.1 Marcadores moleculares

A denominação de marcadores moleculares remete para as diferentes sequências hereditárias de DNA (polimorfismos), fenotipicamente neutras que do ponto de vista ambiental e de desenvolvimento se encontram estáveis.

Marcadores moleculares são utilizados em biologia molecular para identificar uma sequência particular de DNA. Pelo facto destas sequências de DNA serem características e por vezes únicas, são uma ferramenta importante na identificação da diversidade microbiana, uma vez que determinados marcadores podem encontrar uma sequência particular de DNA dentro de um genoma (Xu 2006).

Dois grupos de marcadores são considerados consoante a sua forma de detecção. Assim encontramos marcadores moleculares detectados a partir de hibridizações do tipo “Southern”, como os RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), e marcadores moleculares baseados em metodologias inerentes a técnica da Reacção em cadeia da polymerase (PCR) (Mullis & Faloona 1987), tais como RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AFLP (amplification fragment length polymorphism), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence), SSR (simple sequence repeat) e SNP (single nucleotide polymorphisms) (Martin *et al.* 1998).

As aplicações práticas de marcadores moleculares são alargadas, abrangendo desde o mapeamento genético, à genotipagem, à protecção de cultivares, à avaliação da diversidade genética, à identificação de patógenos de plantas, à identificação de doenças genéticas humanas, até aos estudos de ciência forense e determinação paternal, passando também pela identificação de espécies (Gherbawy & Voigt 2010).

Com os recentes avanços da biotecnologia, diferentes marcadores moleculares têm sido empregues para a rápida identificação de diferentes tipos de fungos. Notavelmente, o desenvolvimento de *primers* específicos para a amplificação por PCR (White *et al.* 1990; Gardes & Bruns 1996) facilitou estudos sistemáticos e possibilitou a identificação da diversidade fúngica em ecossistemas complexos de uma forma pouco dispendiosa, rápida e precisa (Horton 2002).

1.2.2 Região ITS

A identificação molecular de fungos ao nível da espécie é baseada sobretudo na análise da região variável do DNA ribossomal (rDNA), mais especificamente a região ITS (“*Internal Transcribed Spacer*”). Esta região possui zonas fortemente conservadas mas com alta variabilidade (Horton 2002) o que a torna ideal para o desenvolvimento de primers de PCR para uma identificação específica (White *et al.* 1990).

Primers universais estão disponíveis para o isolamento das regiões ITS que uma vez clonadas podem ser comparadas com sequências em base de dados, permitindo a identificação de um fungo em particular (Atkins & Clark 2004). Mais de 100000 sequências obtidas pelo método de sequenciamento de Sanger encontram-se depositadas nos bancos de dados internacionais de sequências de nucleótidos fornecendo uma referência fidedigna para a identificação de espécies de fungos (Kikuchi *et al.* 2007).

Os primers específicos para a região ITS, aproveitam as regiões conservadas das zonas 18S, 5.8S e 28S, para amplificar as regiões não codificantes que as separam (White *et al.* 1990; Gardes & Burns 1996).

O RNA ribossomal (rRNA) é necessário em quantidades elevadas de forma a produzir os ribossomas celulares. Assim existem múltiplas cópias dos genes de rRNA, muitas vezes dispostos em *tandem* mas separados por espaçadores não transcritos (Hershkovitz & Lewis 1996).

Nos eucariotas, os genes que codificam os RNAs ribossómicos estão organizados em matrizes repetitivas que envolvem as unidades, 18S, 5.8S e 28S, dois espaçadores internos (ITS1 e ITS2) e dois espaçadores externos (5´ e 3´ ETS) (Figura 5) (Karabecna 2007). A RNA polimerase I transcreve estas unidades genéticas e os produtos resultantes são processados no nucléolo, onde ocorre a excisão das regiões ITS1 e da ITS2 e a produção de três tipos de RNAs diferentes. As regiões ITS são biologicamente importantes no processamento do rRNA, uma vez que formam estruturas secundárias específicas, imprescindíveis para o correcto reconhecimento de locais de clivagem e para a ligação de proteínas e RNAs nucleolares durante a maturação dos ribossomas. Pela sua importância são zonas altamente conservadas, nas quais no entanto é biologicamente admissível a alteração do seu tamanho e das suas sequências, desde que esta variação não altere a a formação de estruturas secundárias e o consequente processamento do rRNA (Bellemain *et al.* 2010).

Os espaçadores ITS1, ITS2 e o rDNA 5.8S são regiões ótimas para estudos de diversidade, devido ao seu grande número de cópias no genoma e serem assim regiões de fácil amplificação, pelo facto de não estarem sujeitas a transferência horizontal e devido ao elevado grau de polimorfismo apresentado entre espécies distintas (White *et al.* 1990; Martin & Rygiewicz 2005).

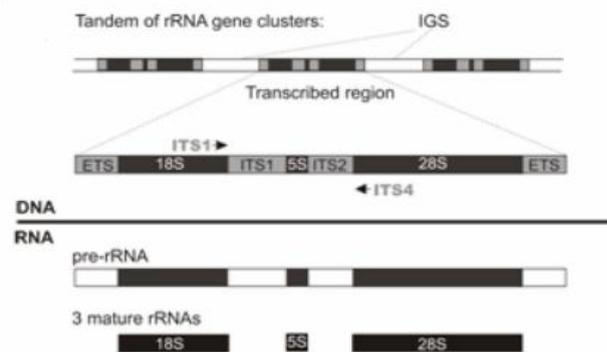


Figura 5 - Matriz repetitiva do rDNA com as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 (Korabecna 2007).

A região ITS demonstra assim uma grande variação inter-específica, uma vez que beneficiam de uma rápida taxa de evolução, sendo frequentemente utilizados na identificação, quer de espécies taxonomicamente próximas, quer de espécies pertencentes a grupos mais distantes. As zonas ITS1 e ITS2 não são estudadas unicamente com fins ecológicos, mas também com o propósito de desenvolver, por exemplo, estratégias de diagnóstico para a identificação de espécies patogénicas em medicina (Martin & Rygiewicz 2005).

1.3 Objectivos

Este trabalho surge no âmbito do projecto PTDC/HAH/652/2006 – Diversidade fúngica em documentos históricos: identificação molecular e implementação de estratégias de controlo para a preservação do património arquivístico.

A baixa diversidade fúngica encontrada no ar do Arquivo em trabalhos anteriores, sugere a possibilidade de haver outras formas complementares de disseminação e posterior contaminação de documentos por espécies fúngicas.

A dispersão por zoocoria, utilizando artrópodes como vectores de dispersão, surge como uma das explicações mais plausíveis, uma vez que estes invertebrados circulam livremente pelo Arquivo, podendo contribuir para a disseminação de propágulos fúngicos entre os documentos.

Os objectivos deste estudo são resumidos em três pontos essenciais:

1. Avaliar o papel dos artrópodes como dispersores de fungos e potenciais vectores de contaminação entre documentos.
2. Entender o efeito da sazonalidade na diversidade de fungos associados aos insectos.
3. Verificar a diversidade de fungos associados as diferentes ordens de insectos.

Pretende-se desta forma compreender a relação possível entre as espécies fúngicas encontradas no ar, nos documentos e associadas aos invertebrados que circulam no Arquivo da Universidade de Coimbra, uma vez que os resultados obtidos poderão fornecer uma lista de espécies de fungos comumente encontrados em invertebrados, que pode ser posteriormente utilizada com vista ao desenvolvimento de estratégias para evitar a dispersão vectorial de fungos por artrópodes em locais similares ao AUC.

Capítulo II – Materiais e métodos

2.1 Locais e métodos de amostragem

Todas as amostras analisadas neste trabalho foram recolhidas no Arquivo da Universidade de Coimbra. Dez armadilhas de base colante para insectos (Figura 6A) foram colocadas aleatoriamente em cada uma de oito secções de seis pisos diferentes (ver Anexo 1). O tipo mais comum de armadilha utilizado em museus e arquivos são armadilhas de base colante. Este tipo de armadilha consiste numa construção de cartão, normalmente triangular com as superfícies interiores revestidas com uma cola não tóxica. As armadilhas não apresentavam qualquer substancia atractiva, ocorrendo a captura pelo movimento dos invertebrados sobre a superfície colante (Figura 6B).

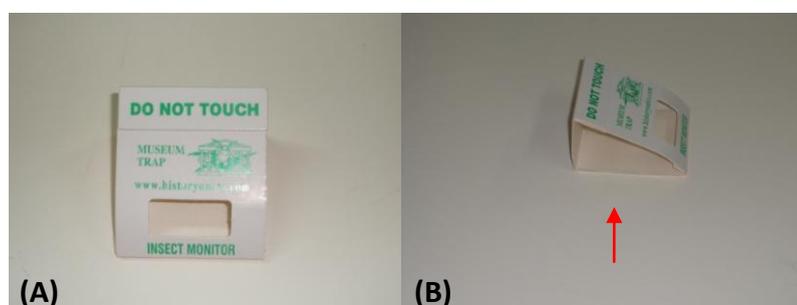


Figura 6 - (A) Armadilha de base colante utilizada para a captura de artrópodes (B) Localização da superfície colante.

2.2 Colheita de artrópodes

Os artrópodes foram colhidos das armadilhas colocadas nos diferentes pisos e secções do Arquivo, realizando-se na totalidade 7 colheitas durante o período de um ano. De forma a permitir uma análise do efeito da sazonalidade, todas as armadilhas foram verificadas a cada 2-3 meses, efectuando-se duas recolhas para cada estação, com excepção da Primavera, estação na qual tal não foi possível, por impossibilidade de acesso ao Arquivo.

A colheita foi realizada recorrendo a uma lâmina de um bisturi estéril de forma a destacar os artrópodes da cola das armadilhas, tendo sido colocados individualmente em eppendorfs (Figura 7), registando-se a ordem correspondente do invertebrado e a armadilha da qual ele foi colhido (p.e. Thysanura - A23).



Figura 7 - Pormenor de um invertebrado, após colheita.

2.3 Preparação das amostras

Aos diferentes eppendorfs com os invertebrados colhidos, foram adicionados 200 µl de água ultrapura efectuando-se posteriormente a maceração com a ajuda de um pistão de teflon acoplado a um homogenizador *Franz Morat KG framo Garatetchnik tipo R-25* (Figura 8).

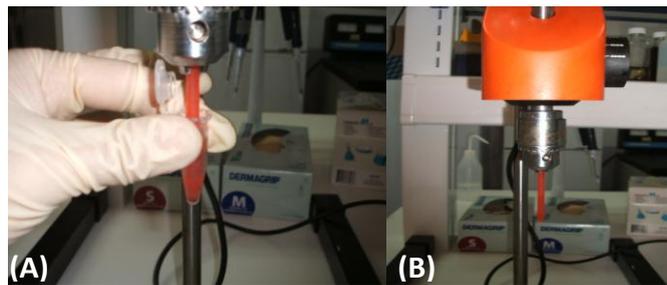


Figura 8 - (A) Processo de maceração. (B) Homogenizador utilizado para a maceração dos invertebrados colhidos.

O meio de cultura utilizado para a inoculação do homogeneizado resultante da maceração dos artrópodes foi o meio PDA (*Difco*TM *Potato Dextrose Agar*).

Este meio é composto por uma mistura de infusão de batata, D (+) glucose e ágar-ágar, sendo preparado pela suspensão de 39g num litro de água destilada seguido de uma esterilização por autoclavagem a 121 °C, a pressão de 1 atm durante 15 minutos. Após um arrefecimento ligeiro (Figura 9) adicionou-se o antibiótico estreptomicina a 0.5g/L (*Sigma*, EUA), de forma a prevenir o crescimento bacteriano.

Os meios foram de seguida vertidos sobre placas de Petri de 9 cm e de 5 cm, numa câmara de fluxo laminar de forma a solidificarem (Figura 9), sendo posteriormente seladas com parafilme e guardadas numa caixa fechada em local fresco e sem luz directa incidente durante cerca de dois dias até a sua utilização para a inoculação das amostras homogeneizadas.

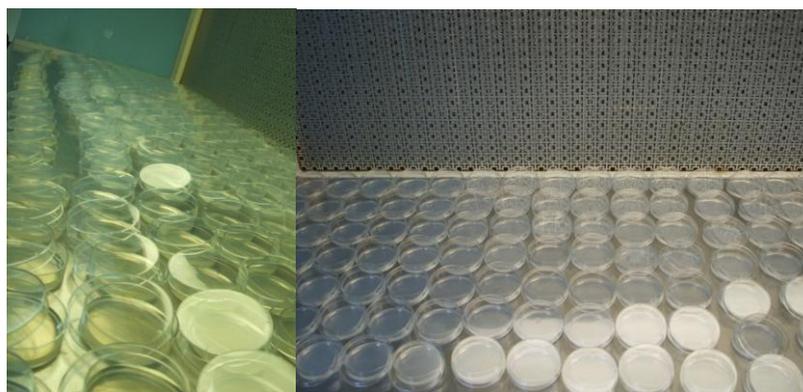


Figura 9 - Meios de cultura a secar numa câmara de fluxo laminar.

A inoculação foi efectuada colocando 9 gotas (cerca de 40 μ l) do homogeneizado, com recurso a uma pipeta, em caixas de petri de 9 cm permitindo a incubação em meio PDA, por um período de cinco a dez dias a 28 ± 1 ° C.

2.4 Isolamento

As diferentes colónias emergentes foram isoladas em culturas puras em caixas de Petri de 5 cm, incubando-se durante cinco a dez dias a 28 ± 1 ° C, de acordo com a sua taxa de crescimento. Contudo, as placas foram mantidas durante 18 a 20 dias para assegurar que fungos com crescimento lento fossem igualmente isolados. Às novas colónias foram atribuídas um número de identificação consistindo no número da armadilha seguido de uma letra para cada novo isolado (p.e. A23A- isolado A do artrópode *Thysanura* colhido na armadilha 23). Desta forma é possível a análise das espécies fúngicas associadas a cada tipo de artrópode.

2.5 Identificação e análise da região ITS

2.5.1 Extracção de DNA

Quando as novas colónias apresentavam um crescimento suficiente para a extracção de DNA, procedeu-se à sua remoção por raspagem com uma lâmina de um bisturi estéril, seguida da maceração das colónias em eppendorfs com 200 μ l de *NucPrep*

DNA Purification Solution recorrendo a um homogenizador *Franz Morat KG framo Garatetchnik* tipo R-25.

A extracção do ADN total realizou-se com recurso ao extractor *ABI Prism 6100™ PrepStation* da *Applied Biosystems* (EUA) (Figura 10) de acordo com as normas do fabricante (ver Anexo 2). O protocolo consiste em 3 passos que correspondem a uma fase de Homogenização, seguida de uma fase de pré- filtração e por fim uma fase de purificação.



Figura 10 – Extractor semi-automático *ABI Prism 6100™ PrepStation*.

A homogenização de tecido é realizada após a adição de 600 μl de *NucPrep DNA Purification Solution* perfazendo um volume total de 800 μl , seguido de uma lise dos tecidos durante 30 segundos. A pré- filtração é realizada pelo carregamento dos poços com 750 μl do tampão e o tecido lisado que posteriormente passa por uma filtração a vácuo. A purificação é realizada pela adição de 40 μl do reagente *NucPrep DNA Purification Solution* aos poços e pela adição das amostras.

2.5.2 PCR e electroferese em gel de agarose

O DNA extraído foi sujeito a amplificação total da região ITS por PCR, utilizando para isso os primers ITS1-F e ITS4 (White *et al.* 1990; Gardes & Bruns 1996).

Para um volume final de amplificação de 25 μl , a *mix* de PCR é composta por 12,5 μl de Jump Start Taq DNA Polimerase com MgCl_2 (*Sigma D9307*), 0,5 μl de cada primer (10 mM), 10,5 μl de água ultrapura e 1 μl de DNA total.

Tabela 2 - Sequências dos *primers* específicos para amplificação total da região ITS do ADN ribossomal (ITS4 corresponde ao *primer* reverso).

Primer	Sequência (5´- 3´)	TA (°C)	Referência
ITS1-F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	65°C	Gardes & Bruns 1996
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58°C	White <i>et al.</i> 1990

As reacções de PCR (Figura 11A) foram realizadas utilizando o termociclador *ABI GeneAmp PCR System 9700*, com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 ° C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 1 min, “annealing” a 53 ° C durante 1 min , extensão a 72 ° C durante 1 min, com uma extensão final a 72 ° C durante 5 min.

A confirmação visual da amplificação total da região ITS foi realizada utilizando a electroforese em gel de agarose (1,2%) corado com *GelRed (Biotium, EUA)* (Figura 11B) e fotografado num Transiluminador (*Vilber Lourmat*) sob luz UV.

O gel de agarose foi preparado pela dissolução de 0,6 g de agarose (*Pharmacia Biotech, Suécia*) em 50 ml de TBE 1x (*Sigma, EUA*) e posteriormente corado com 0,3 µl de *GelRed (Biotium, EUA)*, tendo o gel corrido durante 30 minutos a 100V e 120A.

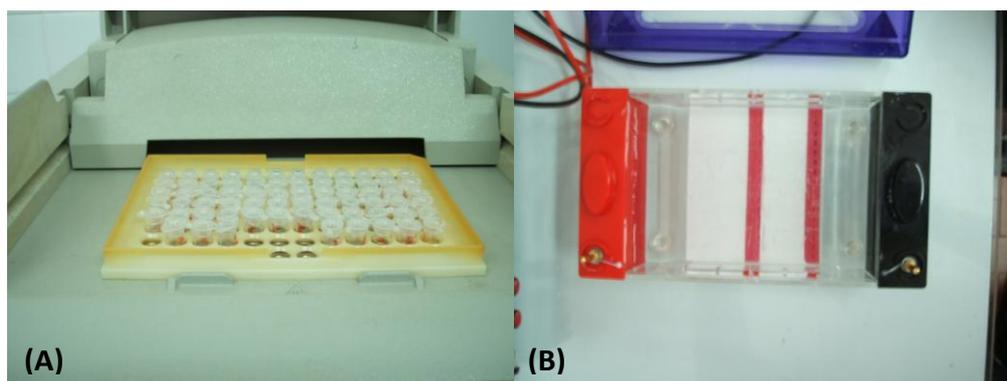


Figura 11 - (A) Eppendorfs com os produtos de PCR. (B) Poços de um gel de agarose carregados.

2.5.3 Sequenciação e BLAST

A sequenciação da região ITS foi realizada com o sequenciador *ABI 3730 Genetic Analyzer*, usando o kit *Big Dye v.3 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)* e utilizando o primer ITS4.

As Sequências genéticas foram analisadas utilizando o software bioinformático *Geneious 5.3.6*™ (www.geneious.com). As sequências obtidas foram submetidas ao BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) com vista à comparação com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI, com o intuito de avaliar a similaridade com as sequências publicadas.

Por fim as sequências obtidas foram submetidas à base de dados informática *Genebank*.

2.5.4 Identificação morfológica

Com o intuito de confirmação dos resultados obtidos pela identificação molecular, uma análise macroscópica e microscópica de características taxonômicas distintas foi realizada.

A análise macroscópica realizou-se pela visualização da morfologia das colônias e pela pigmentação apresentada em meio PDA. A análise microscópica foi realizada pela observação ao microscópio óptico de características distintivas do genero correspondente, e no caso de espécies raras pela biometria de estruturas típicas da espécie em questão.

2.6 Análise estatística

Obtida uma confirmação das espécies em questão, foi realizada uma análise estatística, utilizando para isso o índice de Shannon-Wiener ($H' = -\sum P_i \ln(P_i)$) e a equitatividade de espécies ($E = H'/\ln(S)$), relativo a cada andar, a cada ordem de artrópodes, e a cada estação do ano.

O índice de Shannon-Wiener é um dos vários índices de diversidade usados para medir a diversidade em dados categóricos. Baseia-se na análise da entropia, tratando a distribuição de espécies e tamanho da população como uma probabilidade.

O índice é usado para determinar medidas de biodiversidade que levam em conta o número de espécies, e as espécies dominantes de acordo com sua distribuição dentro de uma amostra (Frosini 2003).

O resultado do índice deve encontrar-se dentro dos valores médios de ($0 < H' < \ln(S)$) e o resultado da equitabilidade de espécies entre os valores médios de ($0 < E < 1$).

Relativamente ao índice de Shannon-Wiener de acordo com a ordem dos artrópodes capturados, a primeira colheita não foi tida em conta uma vez que a identificação das ordens do invertebrado não foi feita.

Capítulo III – Resultados

3.1 Identificação molecular e morfológica

Todos os isolados (Tabela 3) foram inicialmente identificados pelo recurso à amplificação da região ITS total e complementados posteriormente com a identificação de caracteres taxonômicos típicos, verificando-se uma correspondência total entre as duas formas de identificação. Todas as sequências obtidas encontram-se publicadas no *Genebank* (JQ781700 - JQ781847).

A região ITS foi amplificada com recurso aos *primers* ITS 1F e ITS 4 (White *et al.* 1990; Gardes & Bruns 1996), obtendo-se um fragmento de 600 pb de DNA em todos os isolados fúngicos (Figura 12).

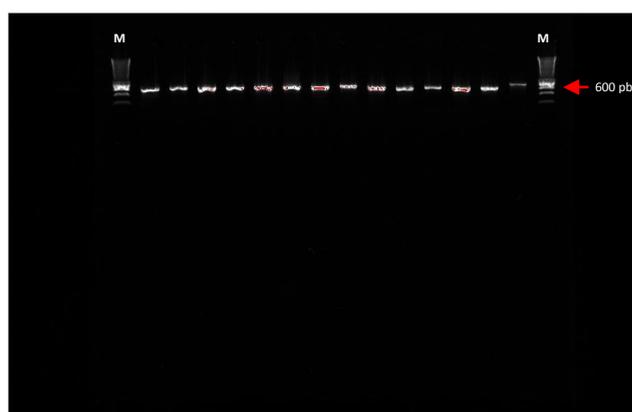


Figura 12 - Fotografia de um gel de agarose corado com *GelRed* (Biotium, USA), sob radiação UV demonstrando a amplificação total da região ITS por PCR utilizando os *primers* ITS1-F e ITS4 para vários isolados. (M - marcador molecular (HyperLadder)).

Para confirmar a identificação molecular, as diferentes culturas foram identificadas até o nível do género de acordo com sua morfologia macro e microscópica (Watanabe 2002), observando-se a forma de crescimento da colónia e a sua pigmentação, o surgimento de corpos frutíferos (se visíveis) pelo recurso a observações ao microscópio óptico. A título de exemplo é possível verificar características típicas dos géneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* na figura 13.

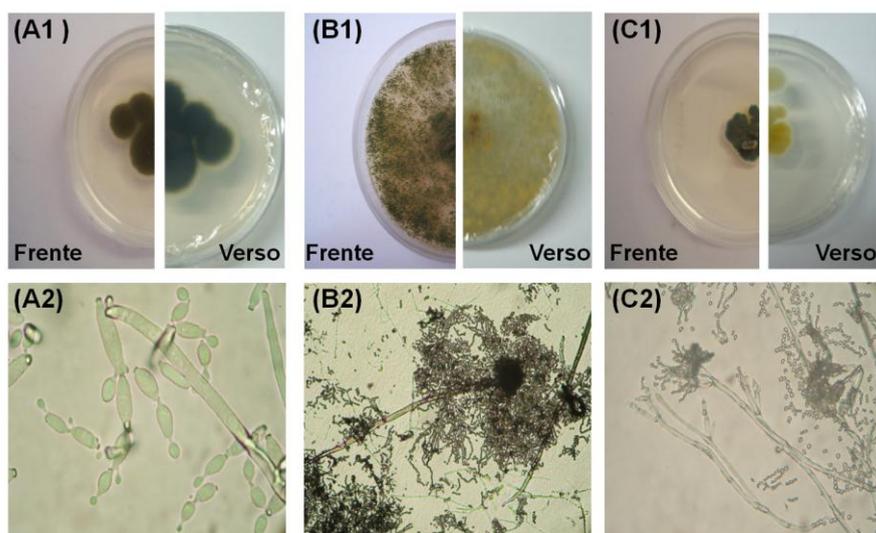


Figura 13 - (A1) Morfologia de uma colônia de *Cladosporium* sp.; (A2) conidióforos e cadeias de conídios de *Cladosporium* sp. visualizados ao MO 400x; (B1) Morfologia de uma colônia de *Aspergillus* sp.; (B2) cabeça de conídios de *Aspergillus* sp. visualizada ao MO 1000x; (C1) Morfologia de uma colônia de *Penicillium* sp.; (C2) conidióforos e conídios de *Penicillium* sp. visualizados ao MO 400x;

3.2 Diversidade fúngica associada a artrópodes

A Tabela 3 representa os resultados da identificação das espécies fúngicas associadas às diversas amostras colhidas no período compreendido entre o Outono de 2010 e o Inverno de 2011, bem como a localização da armadilha de onde a amostra é proveniente, a ordem do artrópode que lhe deu origem, o número da colheita e a sua percentagem de similaridade com as sequências depositadas nas bases de dados .

Tabela 3 – Identificação dos isolados fúngicos obtidos após isolamento em PDA, por armadilha, local, estação do ano, colheita, e ordem do artrópode capturado. (N.I.- Não identificado, sp.- Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular.)

Armadilha	Isolado	Piso	Secção	Colheita	Estação	Artópode (Ordem)	Identificação	Similaridade	"Accession Number"
A06	A	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	99%	JQ781705
A06	B	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	99%	JQ781706
A06	C	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	99%	JQ781707
A06	D	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	99%	JQ781708
A06	E	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	99%	JQ781709
A07	A	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium miniobitum</i>	99%	JQ781710
A07	B	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Coniothyrium sporulosum</i>	99%	JQ781711

(Cont. Tabela 3)

Armadilha	Isolado	Piso	Secção	Colheita	Estação	Artópode (Orden)	Identificação	Similaridade	"Accession Number"
A07	C	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium commune</i>	99%	JQ781712
A07	D	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium commune</i>	99%	JQ781713
A07	E	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium commune</i>	99%	JQ781714
A07	F	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium commune</i>	100%	JQ781715
A07	G	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Aspergillus nomius</i>	83%	JQ781716
A10	A	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Aspergillus nomius</i>	99%	JQ781719
A10	B	2	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Stroscum hirsutum</i>	99%	JQ781720
A12	A	2	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Aspergillus nomius</i>	99%	JQ781726
A12	B	2	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Aspergillus nomius</i>	99%	JQ781727
A16	A	2	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Leocanicillium psalliotae</i>	100%	JQ781732
A22	A	Cave		0	Outono '10	N.I.	<i>Aspergillus versicolor</i>	99%	JQ781743
A28	B	Cave		0	Outono '10	N.I.	<i>Biscogniauxia Bazziana</i>	100%	JQ781747
A28	C	Cave		0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium brasilianum</i>	100%	JQ781748
A28	D	Cave		0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium bilaiae</i>	100%	JQ781749
A28	E	Cave		0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium bilaiae</i>	100%	JQ781750
A28	F	Cave		0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium bilaiae</i>	100%	JQ781751
A35	A	3	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Cladophorium cladophorioides</i>	99%	JQ781771
A35	B	3	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Aspergillus versicolor</i>	99%	JQ781772
A35	C	3	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781773
A35	E	3	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Alternaria arborescens</i>	97%	JQ781774
A35	F	3	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Alternaria sp.</i>	100%	JQ781775
A40	A	3	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	JQ781777
A52	A	4	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781778
A52	B	4	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Cladophorium sphaerogenum</i>	100%	JQ781779
A53	A	4	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium decaturense</i>	99%	JQ781783
A53	A1	4	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Cladophorium cladophorioides</i>	83%	JQ781784
A53	B	4	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Cladophorium cladophorioides</i>	100%	JQ781785
A60	A	4	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	99%	JQ781799
A63	A	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	JQ781800
A63	C	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Cladophorium cladophorioides</i>	100%	JQ781801
A63	D	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium crustosum</i>	100%	JQ781802
A63	E	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium decaturense</i>	99%	JQ781803
A63	F	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium islandicum</i>	99%	JQ781804
A65	A	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium decaturense</i>	99%	JQ781811
A65	B	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium decaturense</i>	99%	JQ781812
A65	C	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium brevicompectum</i>	99%	JQ781813
A65	D	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium brevicompectum</i>	97%	JQ781814
A65	E	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium sp.</i>	100%	JQ781815

(Cont. Tabela 3)

Armadilha	Isolado	Piso	Secção	Colheita	Estação	Artópode (Ordem)	Identificação	Similaridade	"Acessão Number"
A70	A	6	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781825
A77	A	6	2	0	Outono '10	N.I.	<i>Poecilomyces lilacinus</i>	99%	JQ781830
A87	A	5	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Chaetomium nigricolor</i>	99%	JQ781840
A87	B	5	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Alternaria infectoria</i>	100%	JQ781841
A87	C	5	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium brevicampetum</i>	99%	JQ781842
A87	D	5	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium sp.</i>	99%	JQ781843
A87	E	5	3	0	Outono '10	N.I.	<i>Penicillium crustosum</i>	97%	JQ781844
A23	A	Cave		I	Inverno '10	Thysanura	<i>Glodasporium glodasporioides</i>	99%	JQ781746
A29	A	Cave		I	Inverno '10	Thysanura	<i>Glodasporium sp.</i>	100%	JQ781760
A53	C	4	3	I	Inverno '10	Thysanura	<i>Penicillium olsonii</i>	99%	JQ781786
A55	C	4	3	I	Inverno '10	Diptera	<i>Glodasporium pini-ponderosae</i>	100%	JQ781788
A56	A	4	3	I	Inverno '10	Thysanura	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781734
A56	B	4	3	I	Inverno '10	Thysanura	<i>Cryptosphaeria subcutanea</i>	99%	JQ781735
A59	A	4	3	I	Inverno '10	Aranese	<i>Penicillium olsonii</i>	99%	JQ781736
A59	B	4	3	I	Inverno '10	Aranese	<i>Penicillium olsonii</i>	99%	JQ781737
A66	A	6	3	I	Inverno '10	Thysanura	<i>Penicillium dendriticum</i>	99%	JQ781816
A69	C	6	3	I	Inverno '10	Thysanura	<i>Glodasporium sp.</i>	99%	JQ781821
A85	A	5	3	I	Inverno '10	Diptera	<i>Aspergillus niger</i>	99%	JQ781837
A15	A	2	2	II	Primavera '10	Diptera	<i>Aspergillus nomius</i>	99%	JQ781730
A15	B	2	2	II	Primavera '10	Diptera	<i>Aspergillus chaoqingensis</i>	99%	JQ781731
A55	E	4	3	II	Primavera '10	Diptera	<i>Aspergillus parasiticus</i>	99%	JQ781789
A55	E2	4	3	II	Primavera '10	Diptera	<i>Aspergillus parasiticus</i>	99%	JQ781730
A55	F	4	3	II	Primavera '10	Diptera	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99%	JQ781731
A64	A	6	3	II	Primavera '10	Thysanura	<i>Penicillium dendriticum</i>	99%	JQ781805
A64	B	6	3	II	Primavera '10	Thysanura	<i>Penicillium dipodomycicola</i>	100%	JQ781806
A66	B	6	3	II	Primavera '10	Aranese	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781817
A69	C2	6	3	II	Primavera '10	Diptera	<i>Acromonium furcatum</i>	87%	JQ781822
A05	A	2	3	III	Verão '10	Aranese	<i>Daldinia concentrica</i>	99%	JQ781703
A05	B	2	3	III	Verão '10	Coleoptera	<i>Daldinia concentrica</i>	98%	JQ781704
A10	C	2	3	III	Verão '10	Aranese	<i>Aspergillus flavus</i>	99%	JQ781721
A22	B	Cave		III	Verão '10	Aranese	<i>Glodasporium sp.</i>	100%	JQ781744
A22	C	Cave		III	Verão '10	Aranese	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99%	JQ781745
A28	G	Cave		III	Verão '10	Thysanura	<i>Thielavia hyalocarpa</i>	99%	JQ781752
A29	B	Cave		III	Verão '10	Thysanura	<i>Penicillium sp.</i>	100%	JQ781761
A55	G	Cave		III	Verão '10	Aranese	<i>Penicillium griseofulvum</i>	100%	JQ781732
A59	C	4	3	III	Verão '10	Aranese	<i>Neonectria discophora</i>	85%	JQ781738
A64	B2	6	3	III	Verão '10	Aranese	<i>Aspergillus versicolor</i>	100%	JQ781807
A79	A	6	2	III	Verão '10	Thysanura	<i>Penicillium sp.</i>	99%	JQ781832

(Cont. Tabela 3)

Armadilha	Isolado	Piso	Secção	Colheita	Estação	Artópode (Ordem)	Identificação	Similaridade	"Accession Number"
A10	E	2	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Periconia macrospinoso</i>	88%	JQ781723
A10	F	2	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Penicillium citrinum</i>	93%	JQ781724
A12	C	2	2	IV	Verão '10	Diptera	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	JQ781728
A12	C2	2	2	IV	Verão '10	Diptera	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	JQ781729
A16	B	2	2	IV	Verão '10	Diptera	<i>Nebriopsis gigante</i>	94%	JQ781733
A28	G2	Cave		IV	Verão '10	Thysanura	<i>Ecovoria Bussiana</i>	100%	JQ781753
A52	C	4	3	IV	Verão '10	Lepidoptera	<i>Penicillium brevicampetum</i>	98%	JQ781780
A52	C1	4	3	IV	Verão '10	Lepidoptera	<i>Aspergillus nomius</i>	80%	JQ781781
A52	D	4	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Nebriopsis gigante</i>	93%	JQ781782
A53	D	4	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Absidia anomala</i>	93%	JQ781787
A55	H	4	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781793
A66	C	6	3	IV	Verão '10	Thysanura	<i>Fomes fomentarius</i>	95%	JQ781818
A66	D	6	3	IV	Verão '10	Thysanura	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781819
A69	D	6	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Aspergillus candidus</i>	93%	JQ781823
A69	D1	6	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Cladosporium sp.</i>	93%	JQ781824
A70	B	6	3	IV	Verão '10	Thysanura	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	100%	JQ781826
A70	C	6	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Ecovoria sp.</i>	100%	JQ781827
A70	D	6	3	IV	Verão '10	Aranese	<i>Penicillium sp.</i>	100%	JQ781828
A70	E	6	2	IV	Verão '10	Aranese	<i>Acromonium strictum</i>	93%	JQ781829
A77	B	6	2	IV	Verão '10	Thysanura	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781831
A85	B	5	3	IV	Verão '10	Thysanura	<i>Nebriopsis gigante</i>	93%	JQ781838
A85	C	5	3	IV	Verão '10	Thysanura	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	JQ781839
A87	F	5	3	IV	Verão '10	Diptera	<i>Altovoria alternata</i>	100%	JQ781845
A03	A	2	3	V	Outono '11	Lepidoptera	<i>Penicillium griseofulum</i>	84%	JQ781700
A03	B	2	3	V	Outono '11	Lepidoptera	<i>Cladosporium sp.</i>	91%	JQ781701
A03	C	2	3	V	Outono '11	Lepidoptera	<i>Penicillium commune</i>	93%	JQ781702
A10	G	2	3	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium commune</i>	93%	JQ781725
A16	B2	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Nebriopsis gigante</i>	94%	JQ781734
A16	C	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium crustosum</i>	98%	JQ781735
A16	D	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium brevicampetum</i>	78%	JQ781736
A16	E	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Aspergillus nomius</i>	84%	JQ781737
A20	A	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium raistrickii</i>	72%	JQ781739
A20	B	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium expansum</i>	94%	JQ781740
A20	C	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium sp.</i>	96%	JQ781741
A20	D	2	2	V	Outono '11	Thysanura	<i>Cladosporium sp.</i>	90%	JQ781742
A28	H	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium commune</i>	100%	JQ781754
A28	I	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Cladosporium sp.</i>	100%	JQ781755
A28	K	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium brevicampetum</i>	93%	JQ781756

(Cont. Tabela 3)

Armadilha	Isolado	Piso	Secção	Colheita	Estação	Artópode (Ordem)	Identificação	Similaridade	"Accession Number"
A29	C	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Alternaria arborescens</i>	99%	JQ781762
A29	D	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Cladosporium sp.</i>	100%	JQ781763
A29	E1	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium commune</i>	99%	JQ781764
A29	E2	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	JQ781765
A29	F	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Armillaria sp.</i>	84%	JQ781766
A29	G	Cave		V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium canescens</i>	100%	JQ781767
A30	A	Cave		V	Outono '11	Lepidoptera	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	JQ781768
A30	B	Cave		V	Outono '11	Lepidoptera	<i>Cladosporium sp.</i>	100%	JQ781769
A30	C	Cave		V	Outono '11	Lepidoptera	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	JQ781770
A64	C	4	3	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium spinulosum</i>	99%	JQ781808
A64	D	4	3	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99%	JQ781809
A64	E	4	3	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium dendriticum</i>	99%	JQ781810
A83	A	5	3	V	Outono '11	Araneeae	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99%	JQ781833
A83	B	5	3	V	Outono '11	Araneeae	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99%	JQ781834
A84	A	5	3	V	Outono '11	Thysanura	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	JQ781835
A84	B	5	3	V	Outono '11	Thysanura	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	100%	JQ781836
A87	G	5	3	V	Outono '11	Araneeae	<i>Engyodontium album</i>	100%	JQ781846
A87	H	5	3	V	Outono '11	Araneeae	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	JQ781847
A07	H	2	3	VI	Inverno '11	Diptera	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99%	JQ781717
A07	I	2	3	VI	Inverno '11	Diptera	<i>Cladophorium cladophorioides</i>	99%	JQ781718
A19	A	2	2	VI	Inverno '11	Diptera	<i>Myxotricum dolosum</i>	99%	JQ781738
A28	M	Cave		VI	Inverno '11	Diptera	<i>Penicillium brevicompactum</i>	85%	JQ781758
A28	N	Cave		VI	Inverno '11	Araneeae	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	JQ781759
A35	G	3	2	VI	Inverno '11	Diptera	<i>Stemphylium solani</i>	99%	JQ781776

De um total de 163 artrópodes capturados ao longo de um ano, 148 isolados correspondendo a 25 géneros diferentes (Figura 12) e 59 espécies diferentes (Figura 13) foram isolados, identificados e mantidos em cultura. Os géneros mais comuns foram *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Alternaria* (Figura 12). Relativamente às espécies dominantes, estas foram *Aspergillus nomius*, *Biscogniauxia mediterranea*, *Cladosporium cladophorioides*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium commune*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium griseofulvum* (Figura 13). Uma correspondência entre o número de isolados fúngicos de cada espécie e a ordem do artrópode da qual foram isolados, encontra-se representada na Tabela 4. A correspondência entre o número

de isolados fúngicos de acordo com as diferentes estações do ano em que os artrópodes foram colhidos encontra-se representada na Tabela 5.

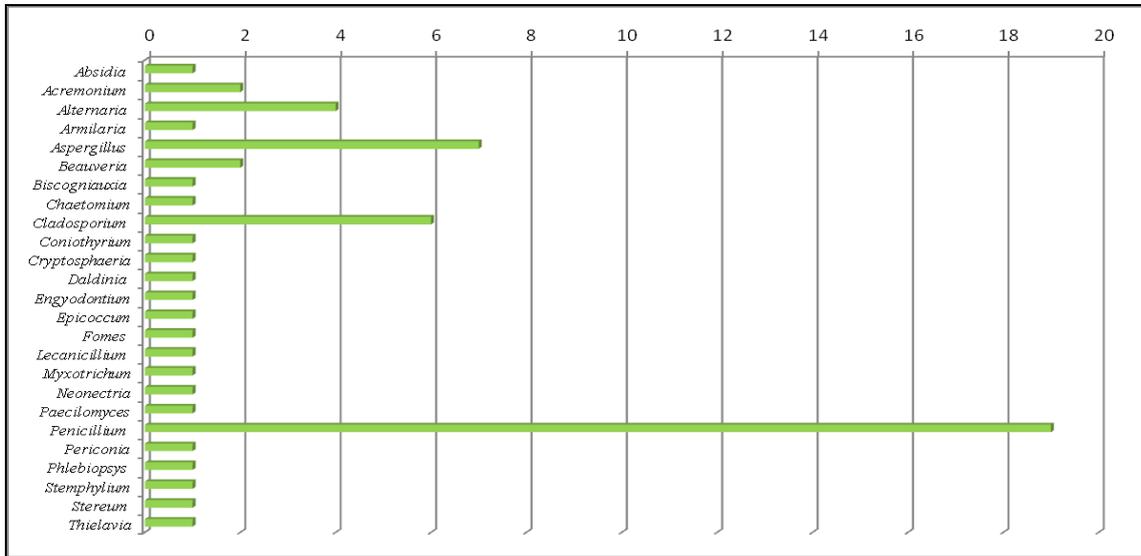


Figura 14 - Número de espécies isoladas em cada gênero.

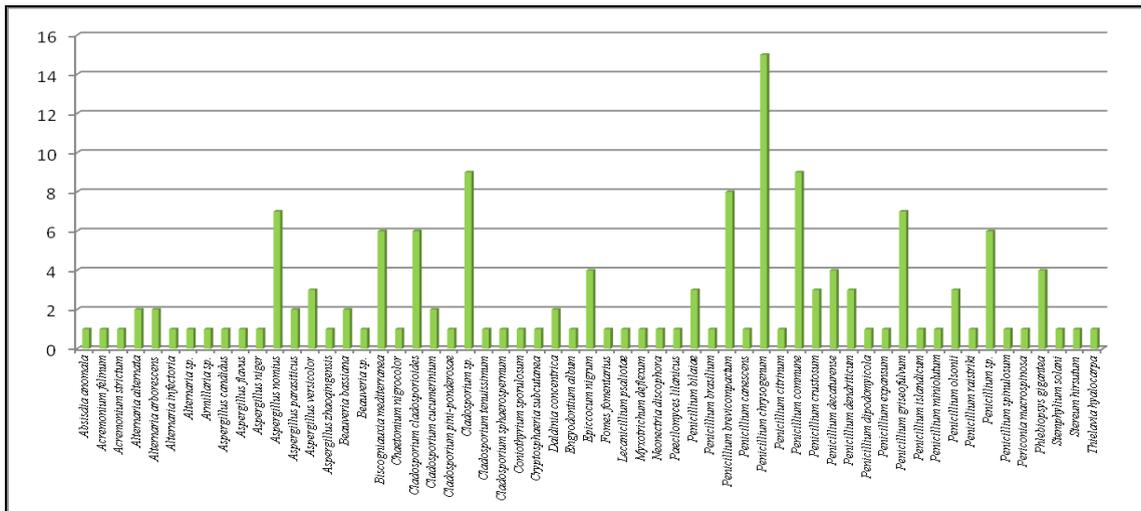


Figura 15 - Número de isolados de cada espécie de fungo.

Tabela 4 - Correspondência entre o número de isolados fúngicos e a ordem do artrópode correspondente do qual foi isolado. (N.I.- Refere-se a 1ª colheita na qual os invertebrados não foram identificados, sp.- Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular.)

Espécie fúngica	Ordem do artrópode					
	Araneae	Coleoptera	Diptera	Lepidoptera	Thysanura	N.I.
<i>Absidia anomala</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Acremonium furcatum</i>	0	0	1	0	0	0

(Cont. Tabela 4)

Espécie fúngica	Ordem do artrópode					
	Araneae	Coleoptera	Diptera	Lepidoptera	Thysanura	N.I.
<i>Alternaria arborescens</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Alternaria infectoria</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Alternaria sp.</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Armillaria sp.</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Aspergillus candidus</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Aspergillus nomius</i>	0	0	1	1	1	4
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0	0	2	0	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0	0	0	0	2
<i>Aspergillus zhaoqingensis</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Beauveria sp.</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	0	0	0	0	0	6
<i>Chaetomium nigrocolor</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	0	1	0	1	4
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	0	0	1	0	1	0
<i>Cladosporium pini-ponderosae</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Cladosporium sp.</i>	2	0	0	2	5	0
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Coniothyrium sporulosum</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Cryptosphaeria subcutanea</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Daldinia concentrica</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Enggodontium album</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0	2	1	0	0
<i>Fomes fomentarius</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Lecanicillium psaliotae</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Mycotrichum deflexum</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Neonectria discophora</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces lilanicus</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Penicillium bilaiae</i>	0	0	0	0	0	3
<i>Penicillium brasilianum</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0	0	2	1	2	3
<i>Penicillium canescens</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	0	0	1	6	5
<i>Penicillium citrinum</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Penicillium commune</i>	0	0	0	1	4	4
<i>Penicillium crustosum</i>	0	0	0	0	1	2
<i>Penicillium decaturense</i>	0	0	0	0	0	4

(Cont. Tabela 4)

Espécie fúngica	Ordem do artrópode					
	Araneae	Coleoptera	Diptera	Lepidoptera	Thysanura	N.I.
<i>Penicillium expansum</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Penicillium griseofulvum</i>	4	0	1	1	1	0
<i>Penicillium islandicum</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Penicillium miniclutum</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Penicillium olsonii</i>	2	0	0	0	1	0
<i>Penicillium raistriki</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Penicillium sp.</i>	1	0	0	0	3	2
<i>Penicillium spinulosum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Periconia macrospicosa</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	1	0	1	0	2	0
<i>Stemphylium solani</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Stereum hirsutum</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Thielavia hyalocarpa</i>	0	0	0	0	1	0

Tabela 5 - Correspondência entre o número de isolados fúngicos e a estação do ano na qual foram colhidos. (sp. - Isolados identificados utilizando apenas a abordagem molecular).

Espécie fúngica	Estação do ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<i>Absidia anomala</i>	0	0	1	0
<i>Acremonium furcatum</i>	0	1	0	0
<i>Acremonium strictum</i>	0	0	1	0
<i>Alternaria alternata</i>	0	0	1	2
<i>Alternaria arborescens</i>	0	0	0	2
<i>Alternaria infectoria</i>	0	0	0	0
<i>Alternaria sp.</i>	0	0	0	1
<i>Armillaria sp.</i>	0	0	0	1
<i>Aspergillus candidus</i>	0	0	1	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	1	0
<i>Aspergillus niger</i>	1	0	0	0
<i>Aspergillus nomius</i>	0	1	1	5
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0	2	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	0	1	2
<i>Aspergillus zhaoqingensis</i>	0	1	0	0
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	1	1
<i>Beauveria sp.</i>	0	0	1	0

(Cont. Tabela 5)

Espécie fúngica	Estação do ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<i>Chaetomium nigroclor</i>	0	0	0	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	0	0	4
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	0	0	2	0
<i>Cladosporium pini-ponderosae</i>	1	0	0	0
<i>Cladosporium sp.</i>	2	0	2	5
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	0	0	0	1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	0	0	1
<i>Coniothyrium sporulosum</i>	0	0	0	1
<i>Cryptosphaeria subcutanea</i>	1	0	0	0
<i>Daldinia concentrica</i>	0	0	2	0
<i>Enggledontium album</i>	0	0	0	1
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0	2	1
<i>Fomes fomentarius</i>	0	0	1	0
<i>Lecanicillium psaliotae</i>	0	0	0	1
<i>Mycostrictum deflexum</i>	1	0	0	0
<i>Neonectria discophora</i>	0	0	1	0
<i>Paecilomyces lilanicus</i>	0	0	0	1
<i>Penicillium bilaiae</i>	0	0	0	3
<i>Penicillium brasilianum</i>	0	0	0	1
<i>Penicillium brevicompactum</i>	2	0	1	5
<i>Penicillium canescens</i>	0	0	0	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	1	4	9
<i>Penicillium citrinum</i>	0	0	1	0
<i>Penicillium commune</i>	0	0	0	9
<i>Penicillium crustosum</i>	0	0	0	3
<i>Penicillium decaturense</i>	0	0	0	4
<i>Penicillium dendriticum</i>	1	1	0	1
<i>Penicillium dipodomyicola</i>	0	1	0	0
<i>Penicillium expansum</i>	0	0	0	1
<i>Penicillium griseofulvum</i>	0	1	2	4
<i>Penicillium islandicum</i>	0	0	0	1
<i>Penicillium minichlutum</i>	0	0	0	1
<i>Penicillium olsonii</i>	3	0	0	0
<i>Penicillium raistriki</i>	0	0	0	1
<i>Penicillium sp.</i>	0	0	3	3
<i>Penicillium spinulosum</i>	0	0	0	1

(Cont. Tabela 5)

Espécie fúngica	Estação do ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	0	0	3	1
<i>Stemphylium solani</i>	1	0	0	0
<i>Stereum hirsutum</i>	0	0	0	1
<i>Thielavia hyalocarpa</i>	0	0	1	0

Pela análise da tabela 4 é possível verificar que as ordens Araneae, Diptera, Lepidoptera e Thysanura encontram-se associadas principalmente com fungos pertencentes aos géneros *Absidia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cladosporium* e *Penicillium* enquanto que à ordem Coleoptera se encontra associada apenas a espécie *Daldinia concentrica*. A tabela de correspondência entre as espécies isoladas e as diferentes estações do ano em que os artrópodes foram colhidos, demonstra uma clara influência das diferentes estações nos isolados fúngicos obtidos. Assim os géneros dominantes no inverno foram *Penicillium* e *Cladosporium*, na primavera *Aspergillus*, no outono *Aspergillus*, *Biscognauxia*, *Penicillium* e *Cladosporium*, enquanto que no verão foram *Penicillium* e *Phlebiopsis*.

3.3 Índices de diversidade

Os índices de biodiversidade (Shannon-Wiener) foram calculados para avaliar a diversidade fúngica encontrada em cada andar analisado, ordem de artrópode colhida e estação do ano na qual a colheita ocorreu, encontrando-se os resultados obtidos apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8 respectivamente. Os valores mais elevados de diversidade fúngica foram encontrados no 2º piso do Arquivo, associados à ordem Thysanura, e durante a estação do Outono. Por outro lado, o piso que apresenta o menor valor de diversidade foi o 3º piso, verificando-se também uma diversidade nula na ordem Coleoptera. A diversidade fúngica encontra-se dentro dos valores médios ($0 < H' < \ln(59) = 4$) com a maioria das espécies distribuídas de uma forma quase uniforme ($0 < E < 1$).

Tabela 6 - Índices de diversidade fúngica por pisos do Arquivo.

Piso	Cave	2º	3º	4º	5º	6º
Nº de isolados	28	43	7	25	15	30
Nº de espécies	16	24	6	17	12	19
Shannon index	2,61	2,91	1,75	2,71	2,39	2,78
Species Evenness	0,64	0,71	0,43	0,66	0,59	0,69

Tabela 7 - Índices de diversidade fúngica correspondentes à análise por ordem de artrópode.

Ordem	Araneae	Coleoptera	Diptera	Leptidoptera	Thysanura
Nº de isolados	25	1	18	8	43
Nº de espécies	18	1	15	7	25
Shannon index	2,76	0	2,66	1,91	2,98
Species Evenness	0,68	0	0,65	0,47	0,73

Tabela 8 - Índices de diversidade fúngica correspondentes à análise por estação do ano.

Estação	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Nº de isolados	35	87	17	9
Nº de espécies	23	36	12	8
Shannon index	3	3,26	2,39	2,04
Species Evenness	0,74	0,79	0,58	0,5

Capítulo IV – Discussão

Ao lidar com a colonização de colecções com valor histórico e cultural por fungos é aconselhável avaliar a comunidade de artrópodes, e os fungos a si associados, de forma a desenvolver contramedidas adequadas com vista ao controlo da disseminação de propágulos e consequente contaminação cruzada por invertebrados (Jurado *et al.* 2008).

Os resultados obtidos neste trabalho são os primeiros resultados relativos à identificação de fungos associados a artrópodes que circulem em bibliotecas reportados em Portugal.

Quanto à identificação dos fungos isolados, a identificação molecular utilizando a sequenciação da região ITS total, complementada com uma análise morfológica, permitiu a identificação da maioria dos isolados com grande precisão. De mais de 180 artrópodes capturados, 148 isolados fúngicos, pertencentes a 25 géneros e 59 espécies foram identificadas sendo os géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* os géneros predominantes.

Esta dominância deve-se em grande parte ao facto de muitas das espécies pertencentes a estes géneros serem ubíquas e entomopatogénicas, e que assim se podem encontrar em cadáveres de artrópodes [6]. Oito dos 25 géneros obtidos (*Aspergillus*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Lecanicillium*, *Penicillium* e *Paecilomyces*) contêm espécies entomopatogénicas [7].

Confirmou-se uma associação entre fungos entomopatogénicos (a partir dos géneros: *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Lecanicillium*, *Penicillium* e *Paecilomyces*) e as ordens dos artrópodes dos quais foram originalmente isoladas (Araneae, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Thysanura). Uma explicação possível é que estas espécies de fungos são um componente comum da micoflora destes artrópodes (Senna 2002; Greif 2007).

A alta frequência das espécies *Aspergillus nomius*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium commune*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium griseofulvum* está de acordo com outros trabalhos (por exemplo Greif 2007), uma vez que se tratam de espécies cosmopolitas que produzem elevadas taxas de mitosporos e conídios.

Os índices de Shannon relativos a cada andar revelaram uma elevada diversidade de fungos. O 2º, 4º, 5º e 6º andares apresentam valores elevados de biodiversidade e os seus valores de equitabilidade sugerem uma distribuição quase similar de espécies dentro de cada andar. O 3º andar apresentou o menor índice de biodiversidade. Este resultado pode ser explicado pelo facto de que neste piso se encontrar a entrada principal

do AUC, e como tal, verifica-se um maior número de pessoas a circular diariamente, um ambiente mais limpo e uma renovação de ar mais frequente, o que se reflecte em condições ambientais precárias para o correcto desenvolvimento de fungos e inclusivé para a circulação de artrópodes.

A partir da análise dos índices de biodiversidade de cada ordem de artrópode, podemos ver que a ordem Lepidoptera apresenta o menor valor de diversidade fúngica, enquanto as ordens Thysanura, Diptera e Araneae apresentam valores de diversidade fúngica muito mais elevados.

À ordem Coleoptera encontra-se apenas associada a espécie *Daldinia concentrica*. Sabe-se que as lagartas do Lepidoptera *Harpella forficella* se alimentam deste fungo (Grabe 1942), no entanto diferentes tipos de insectos e outros pequenos animais utilizam o estroma desta espécie como o seu habitat e, conseqüentemente, podem actuar como vectores de dispersão ou auxiliando na difusão do propágulos fúngicos (Johannesson 2000).

As ordens Araneae, Diptera e Lepidoptera encontram-se associadas principalmente com fungos entomopatogénicos, pertencentes aos géneros *Absidia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cladosporium* e *Penicillium*.

Dois espécies não entomopatogénicas foram identificadas como estando associadas à ordem Thysanura: *Fomes fomentarius* e *Crypthosphaeria subcutanea*. O primeiro é um patógeno de espécies vegetais, enquanto que a segunda tem como habitat comum cascas de árvores (Kibby 2003; Romero 2003). Esporos de fungos correspondentes a estas espécies podem ter estado em contacto com invertebrados durante a polinização de plantas ou servindo como uma fonte de nutrientes para esses animais (Abbot 2002).

O facto da ordem Thysanura apresentar uma elevada diversidade fúngica está provavelmente relacionado com a presença de espécies entomopatogénicas, mas também com os padrões comportamentais destes artrópodes, uma vez que eles se movem sobre objectos enquanto se alimentam de papel, podendo ingerir esporos inadvertidamente, e transportá-los para novos suportes, numa distância curta, uma vez que não são insectos alados (Baverstock *et al.* 2009).

Relativamente à sazonalidade, as estações do inverno e da primavera foram as estações com menor biodiversidade de fungos, enquanto que as estações do verão e do outono apresentaram valores elevados de biodiversidade. Estes resultados estão em conformidade com outros estudos de sazonalidade (Medrela- Kuder 2003).

A formação de propágulos fúngicos em espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* é geralmente influenciada por variações sazonais. As variações sazonais na frequência destas espécies de fungos deve-se à prevalência de esporos de *Aspergillus* no inverno, de *Penicillium* no inverno e primavera, e de *Cladosporium* durante todo o ano, com um maior número de propágulos produzidos durante o verão (Medrela-Kuder 2003).

Comparativamente, as espécies mais comuns neste trabalho foram no inverno *Penicillium olsonii*, *Penicillium brevicompactum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium* sp. na primavera *Aspergillus parasiticus*; no outono *Aspergillus nomius*, *Biscogniauxia mediterranea*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium commune* e *Cladosporium* sp. e no verão *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium brevicompactum* e *Phlebiopsis gigantea*, diferindo dos estudos de sazonalidade de Medrela-Kuder (2003) apenas por uma presença não tão notável de propágulos de *Aspergillus* no inverno e pela presença de propágulos de *Phlebiopsis gigantea* no verão. Estes resultados indicam que a diversidade fúngica associada a artrópodes no AUC é influenciada pelas diferentes estações do ano, estando a propagação dos diferentes géneros de fungos por mecanismos que utilizam vectores fortemente dependente da época do ano em questão.

Relembrando os objectivos deste trabalho, um deles passava por avaliar o papel dos artrópodes como vectores de dispersão e possível contaminação cruzada entre documentos. Comparando os resultados obtidos com os resultados obtidos por Mesquita *et al.* em 2009 em que foi avaliada a diversidade de microfungos em vários documentos de diferentes suportes, verifica-se que 36% (7) das espécies encontradas colonizando documentos foram igualmente isoladas a partir dos artrópodes capturados. Cerca de 21% (4) das espécies isoladas provenientes de amostragens de ar (dados não publicados), também foram identificadas em documentos. É possível verificar que as espécies *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium Cladosporioides* e *Penicillium cucumerinum* foram isoladas nos três ambientes testados (ar, documentos e artrópodes), sendo que a espécie *Aspergillus fumigatus* foi a única espécie isolada do ar e dos documentos que não foi encontrada associada a artrópodes.

Estes resultados apóiam a hipótese de que alguns artrópodes podem actuar como vectores de contaminação entre documentos em ambientes semelhantes ao do Arquivo da Universidade de Coimbra, pelo menos para as espécies *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium canescens* e *Phlebiopsis gigantea*.

Os resultados mostram que algumas das espécies de fungos foram verificadas em associação com os artrópodes e nos documentos, e como tal, desempenham um papel importante no processo de biodeterioração de documentos, considerando que estes fungos podem ser transportados, mas também podem crescer sobre os corpos de artrópodes (devido à presença de espécies entomopatogénicas), facto confirmado pela manutenção da viabilidade de esporos e capacidade de desenvolvimento em meio de cultura PDA.

Confirmado o papel preponderante de invertebrados na dispersão de fungos no Arquivo da Universidade de Coimbra, aconselha-se o desenvolvimento e implementação de algumas estratégias de controlo no que respeita a prevenção da entrada de insectos e outros artrópodes neste local.

O uso de ultra-sons no controlo de insectos e de outras pragas é uma metodologia corrente nos dias de hoje, tendo já sido demonstrada a sua aplicabilidade em laboratório. Diversos dispositivos repelentes baseados nesta técnica são actualmente comercializados (Huang *et al.* 2003).

O uso de técnicas de ultra-sons no controlo de pestes está bem documentado, e poderá ser uma técnica eficaz e facilmente aplicável, com vista à conservação do património histórico presente no AUC.

Capítulo V – Conclusões e perspectivas futuras

O presente estudo permitiu verificar que uma relação de associação entre os artrópodes capturados e as várias espécies de fungos isolados ocorre, verificando-se a presença de 7 espécies (*Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium canescens* e *Phlebiopsis gigantea*) igualmente identificadas em documentos e em artrópodes, o que indica que pelo menos neste local, estas espécies são dispersadas por mecanismos que utilizam vectores.

Pela análise estatística da biodiversidade identificada, conclui-se também que os mecanismos de propagação zoocóricos não são fortemente afectados nos diferentes pisos do Arquivo. Contudo relativamente às estações do ano, é possível verificar que estes mecanismos de dispersão são mais eficientes e activos nas estações do Outono e do Verão.

É possível concluir ainda que 5 ordens de artrópodes (Araneae, Coleoptera, Díptera, Leptidoptera e Thysanura) são as responsáveis pela dispersão de propágulos neste local, com especial ênfase para as ordens Araneae, Díptera e Thysanura cuja grande diversidade associada, as coloca como as principais ordens capazes de transportar uma maior diversidade e densidade de inóculo fúngico.

A continuação deste trabalho é importante numa perspectiva de tentar conter a dispersão de propágulos fúngicos e a consequente contaminação cruzada entre documentos, de forma a complementar estratégias já utilizadas de limpeza com vista a inactivação de espécies fúngicas contaminantes de documentos.

Com as informações obtidas a partir deste estudo, pretende-se agora o desenvolvimento de estratégias seguras que possam contribuir de alguma forma, para a preservação do património cultural armazenado neste local.

Um mecanismo presumivelmente eficaz, ecológico e pouco dispendioso no controlo da dispersão por artrópodes, poderá passar pela utilização de ultra-sons. Estes mecanismos podem ser percebidos pelos artrópodes, levando ao seu afastamento destes locais que conotam como potenciais zonas de predação.

Desejamos que este estudo possa de alguma forma ajudar instituições similares na preservação do seu património.

Capítulo VI – Bibliografía

6.1 Referências Bibliográficas

Abbott S. P. (2002) *Insects and other arthropods as agents of vector-dispersal in fungi*, Oxford University Press, London, UK.

Abrusci C., Martin-Gonzalez A., Del Amo A., Catalina F., Collado J., Platas G. (2005) Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56: 58–68.

Arai H. (2000) Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 181–188.

Atkins S. D., Clark I. M. (2004) Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.* 45: 3-15.

Baverstock J., Roy H. E., Pell J. K. (2009) Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl* 55: 89-102.

Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kauserud H. (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10: 189.

Bennett J.W., Klich M.(2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16:497-516.

Borrego S., Pons V., Perdomo I. (2008) La contaminación microbiana del aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 39: 63-69.

Bouclas D. G., Pendland J. C., Latge J. P. (1988) Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. *Applied and environmental microbiology.* 54: 1795-1805.

Brusca R. C. & Brusca G. J. (2003) *Invertebrates*. 2nd edition, Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA USA.

Coluccio A. E., Rodriguez R. K., Kernan M. J., Neiman A. M. (2008) The Yeast Spore Wall Enables Spores to Survive Passage through the Digestive Tract of *Drosophila*. *PLoS ONE*, 3: 2873.

- Deacon J. W. (2006) *Modern Mycology*. Blackwell Science, Oxford.
- DeBary A. (1887) *Comparative Morphology and Biology of the Fungi, Mycetozoa and Bacteria*. Clarendon Press, Oxford.
- Down R. E., Cuthbertson A. G. S., Mathers J. J., Walters K. F. A. (2009) Dissemination of the entomopathogenic fungi, *Lecanicillium longisporum* and *L. muscarium*, by the predatory bug, *Orius laevigatus*, to provide concurrent control of *Myzus persicae*, *Frankliniella occidentalis* and *Bemisia tabaci*. *Biological Control* 50: 172-178.
- Dromph K. M. (2003) Collembolans as vectors of entomopathogenic fungi. *Pedobiologia*, 47: 245-256.
- Fabbri A. A., Ricelli A., Brasini S., Fanelli C. (1997) Effect of different antifungals on the control of paper biodeterioration caused by fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57: 61–65.
- Frosini B. V. (2003) Descriptive measures of ecological diversity. In *Environmetrics*, A.H. El-Shaarawi and J. Jureckova (Eds.), *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, EOLSS Publishers, Oxford (UK)
- Fuxa J. R., Tanada Y. (1987) Epidemiological concepts applied to insect pathology. *Epizootiology of Insect Diseases*. New York: John Wilwy & Sons.
- Gardes M. & Bruns T. D. (1996) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below- ground views. *Canadian Journal of Botany* 74:1572-1583.
- Gherbawy Y., Voigt K. (2010) *Molecular Identification of Fungi*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Grabe A. (1942) "Eigenartige Geschmacksrichtungen bei Kleinschmetterlingsraupen" *Zeitschrift des Wiener Entomologen*. 27: 105–109.
- Grant C., Hunter C. A., Flannigan B., Bravery A. F. (1989) The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 25: 259–284.

Gravesen S., Nielsen P. A., Iversen R., Nielsen K. F. (1999) Microfungal contamination of damp buildings examples of risk constructions and risk materials. *Environmental Health Perspectives* 107: 505–508.

Greif M. D., Currah R. S. (2007) Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. *Mycologia* 99: 7–19.

Guiamet P. S., Gómez de Saravia S. G. (2007) Biofilms (Biopelículas), biocorrosión y biodeterioro de materiales. *Microbiología Veterinaria*. Inter-Médica S.A., pp. 552-556.

Huang F., Subramanyam B., Taylor R. R. (2003) Ultrasound affects spermatophore transfer, larval numbers, and larval weight of *Plodia interpunctella* (H. (Lepidoptera: Pyralidae)). *Journal of Stored Products Research*, 39: 413-422.

HersHKovitz M. A., Lewis L. A. (1996) Deep-Level Diagnostic Value of the rDNA-ITS Region. *Mol. Biol. Evol.* 13: 127-1295.

Hidalgo Y., Borrego S., (2006) Aislamiento y caracterización de hongos en documentos de la Biblioteca Nacional “José Martí”. *Bibliotecas*. online em: http://www.bnjm.cu/rev_biblioteca/bibliotecas_2006/pages/articulo6.htm.

Holz G., Coertze S., Williamson B. (2007) The Ecology of *Botrytis* on Plant Surfaces. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Netherlands, 9-27.

Horton T. (2002) Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil* 244:29-39.

Hyvärinen A., Meklin T., Vepsäläinen A., Nevalainen A. (2002) Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials — concentrations and diversity. *International Biodeterioration & Biodegradation* 49: 27-37.

Jarvis B. B. (2002) Chemistry and toxicology of molds isolated from water damaged buildings, Mycotoxins and food safety. Kluwer Academic/Plenum Publications, New York, N.Y.

Johannesson H. (2000) Ecology of *Daldinia* spp. with Special Emphasis on *Daldinia loculata*. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Jurado V., Sanchezmoral S., Saizjimenez C. (2008) Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62:325-330.

Karabecna M. (2007) The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 783-787.

Katja S. (2008) Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews*, 24: 47-55.

Kibby G. (2003) *Mushrooms and Toadstools of Britain and Northern Europe*. Hamlyn.

Kikuchi K., Matsushita N., Suzuki K. (2007) Discrimination of *Tricholoma* species by species-specific ITS primers. *Mycoscience* 48:316-320.

Martin F., André Selosse M., Di Battista C., Gherbi H., Delaruelle C., Vairelles D., Bouchard D., Le Tacon F. (1998) Molecular markers in ecology of ectomycorrhizal fungi. *Genetic Sel. Evol.* 30: 333-355

Martin K. J., Rygiewicz P. T. (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5:28.

Medrela-Kuder E. (2003) Seasonal variations in the occurrence of culturable airborne fungi in outdoor and indoor air in Craców. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52: 203-205.

Mesquita N., Portugal A., Videira S., Rodríguez-Echeverría S., Bandeira, A.M.L., Santos M.J.A., Freitas H. (2009) Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 626-629.

Meyling N. V., Pell J. K., Eilenberg J. (2006) Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:121-126.

Meynell G. G., Newsam R. J. (1978) Foxing, a fungal infection of paper. *Nature* 274: 466-468.

Michaelsen A., Pinzari F., Ripka K., Lubitz W., Pinar G.(2006) Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration & Biodegradation* 58:133-141.

Montemartini Corte A., Ferroni A., Salvo V. (2003) Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and the environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51: 167-173.

Mullis K. B. & Faloona F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350.

Nunes S., Sales, Costa G. L., Elias V.R., Bittencourt P. (2002) Isolation of fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) captured at two natural breeding grounds in the municipality of Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 1107– 1110.

Opela V. (1992) Fungal and bacteria attack on motion picture film. FIAF, Joint Technical Symposium, Session 5, Ottawa, Canada, pp. 139-144.

Pendland J. C., Boucias D. G. (1997) In Vitro Growth of the Entomopathogenic Hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *Mycologia* 89: 66-71.

Piñar G., Ripka K., Weber J., Sterflinger K. (2009) The micro-biota of a sub-surface monument the medieval chapel of St. Virgil (Vienna, Austria). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:851-859.

Pinzari F., Pasquariello G., De Mico A. (2006) Biodeterioration of paper: a SEM study of fungal spoilage reproduced under controlled conditions. *Macromolecular Symposia* 238: 57–66.

Rakotonirainy M., Heude E., Lavedrine B.(2007) Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book. *Journal of Cultural Heritage* 8:126-133.

Robert Y. (1987) Dispersion and migration. In: Minks AK, Harrewijn P (eds) *Aphids, their biology, natural enemies and control*, vol A. Elsevier, Amsterdam.

Roets F., Wingfield M. J., Wingfield B. D., Dreyer L. L. (2011) Mites are the most common vectors of the fungus *Gondwanomyces proteae* in *Protea* infructescences. *Fungal Biology*, 115: 343-350.

Rohlf M., Churchill A. C. L. (2011) Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 23-34.

Romero C. (2003) First contribution to the study of Cryptosphaeria from Argentina, *Fungal Diversity*, volume 12.

Roxo E., Campos A. E. C., Alves M. P., Couceiro A.P. M. R., Harakava R., Ikuno A. A., Ferreira V. C. A., Baldassi L., Almeida E. A., Spada D. T. A., Augusto M., Melo F. A. F. (2010) Ants' role (hymenoptera: formicidae) as potential vectors of mycobacteria dispersion. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 77: 359-362.

Ruess L., Lussenhop J. (2005) Trophic interactions of fungi and animals. *The Fungal Community – Its Organization and Role in the Ecosystem*. CRC Press, Boca Raton, 581–598.

Saiz-Jimenez C. (1993) Deposition of airborne organic pollutants on historic buildings. *Atmospheric Environment* 27: 77–85.

Schabereiter-Gurtner C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. (2001) Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *Journal of Microbiological Methods* 4: 345-354.

Schiestl F. P., Steinebrunner F., Schulz C., von Reuss S., Francke W., Weymuth C., Leuchtmann A. (2006) Evolution of 'pollinator'- attracting signals in fungi. *Biology Letters* 2006, 2:401-404.

Sterflinger K.(2010) Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* 24:47-55.

Szczepanowska H., Cavaliere A. R. (2000) Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: a case study of the Tilghman Family Collection, Wye House, Easton, Maryland. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 245–249.

Trail F. (2007) Fungal cannons: explosive spore discharge in the Ascomycota. *FEMS microbiology letters*. 276: 12-18.

Vasconcelos, António de (1991) *O Arquivo da Universidade*. Reedição de Manuel Augusto Rodrigues. Coimbra: A. U. C.

Wainwright M. (2008) Some highlights in the history of fungi in medicine – a personal journey. *Fungal Biology Reviews* 22: 97–102.

Watanabe T. (2002) *Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, second ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Webster J. (1980) *Introduction to Fungi*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

White T. J., Burn, T., Le, S., Taylo, J. (1990) Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, 315–322.

Xu, J. (2006) Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Current issues in molecular biology* 8:75–90.

Gherbawy Y., Voigt K. (2010) *Molecular identification of Fungi*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York.

Zyska B. (1997) Fungi isolated from library materials: a review of the literature. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40: 43–51.

6.2 Referências Online

[1] <http://www.uc.pt/auc/instituicao/historia> (acedido pela última vez a 26/06/2012)

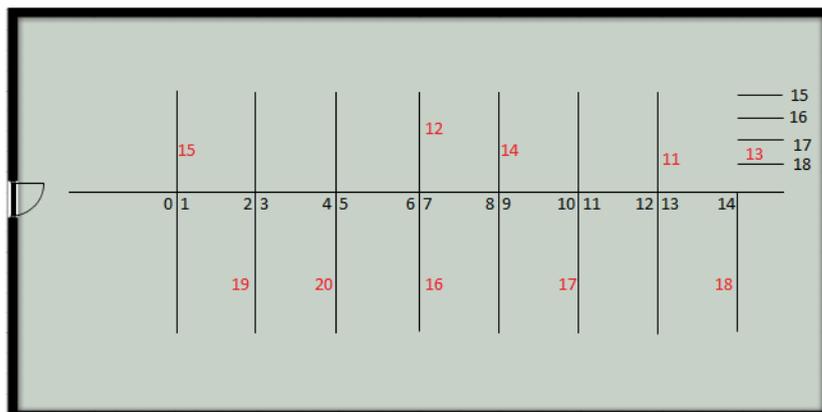
[2] <http://www.uc.pt/auc/instituicao/missao> (acedido pela última vez a 26/06/2012)

[3] <http://herbarium.usu.edu/fungi/funfacts/Dispersional.htm> (acedido pela última vez a 26/06/2012)

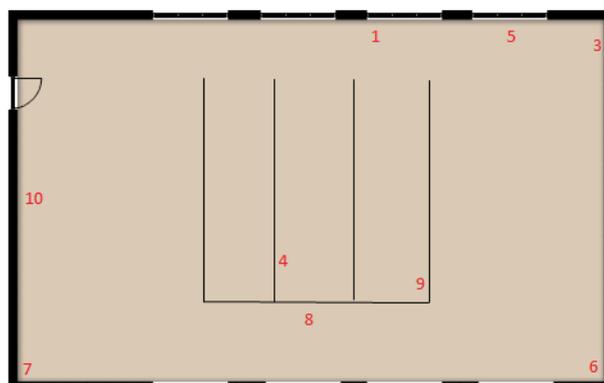
- [4] http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/Lect05_c.htm (acedido pela última vez a 26/06/2012)
- [5] <http://www.countrysideinfo.co.uk/fungi/disperse.htm> (acedido pela última vez a 26/06/2012)
- [6] <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/19070510/APSworkshoprev.pdf> (acedido pela última vez a 26/06/2012)
- [7] <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=12125> (acedido pela última vez a 26/06/2012)

Anexos

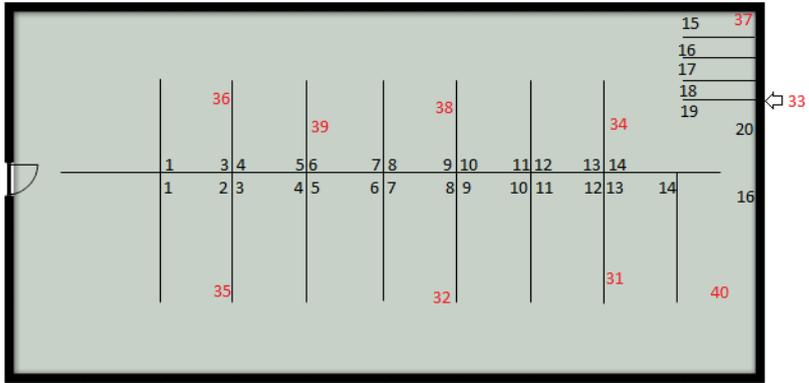
Anexo 1 – Mapas das diferentes secções de cada piso amostrado no AUC, evidenciando estratégias de amostragem e a localização das armadilhas ao longo das diferentes secções (#- Número da estante; # -Número da armadilha).



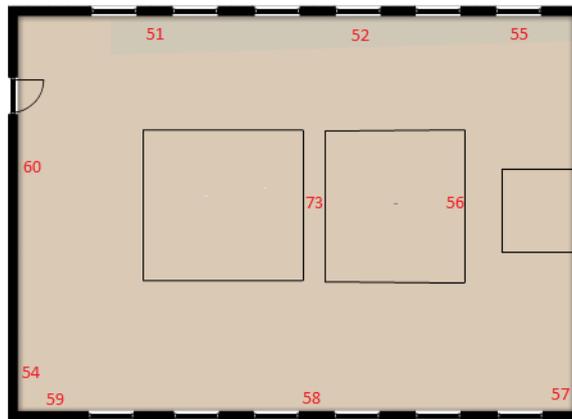
Mapa 1 – 2º Piso; 2ª Secção;



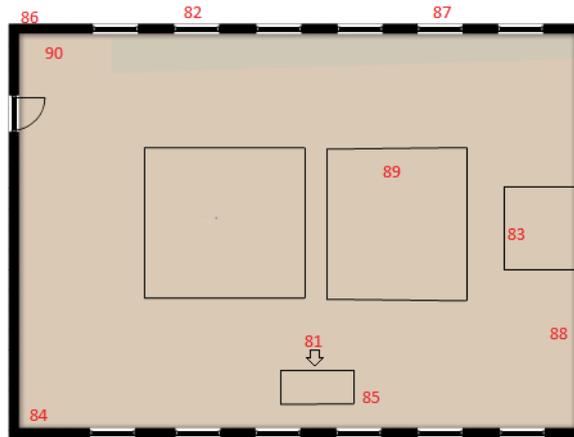
Mapa 2 – 2º Piso; 3ª Secção;



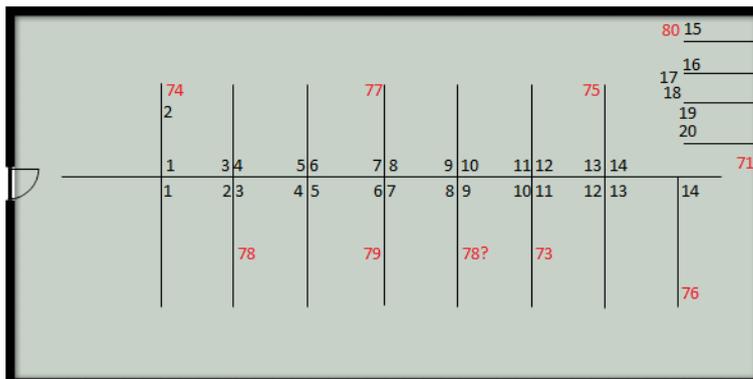
Mapa 3 – 3º Piso; 2ª Secção;



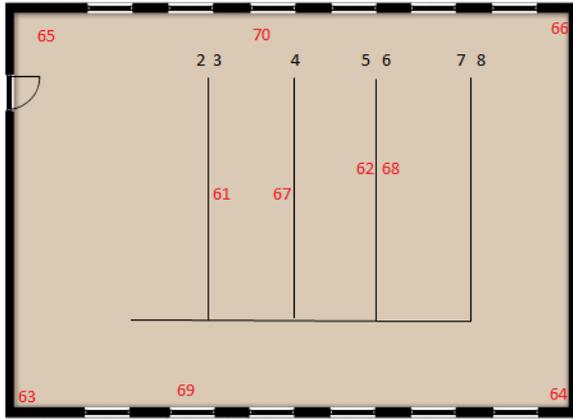
Mapa 4 – 4º Piso; 3ª Secção;



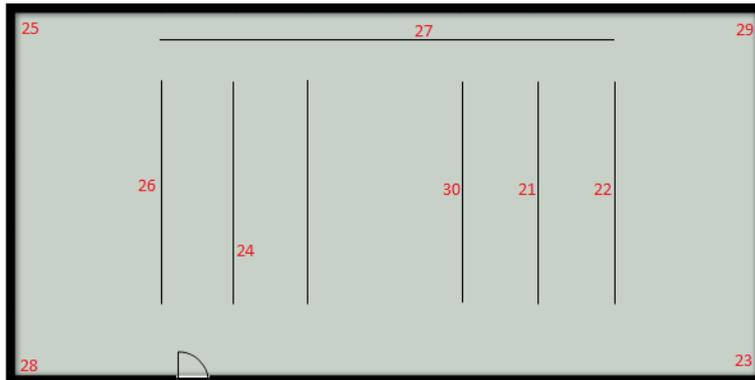
Mapa 5 – 5º Piso; 3ª Secção;



Mapa 6 – 6º Piso; 3ª Secção;



Mapa 7 – 6º Piso; 3ª Secção;

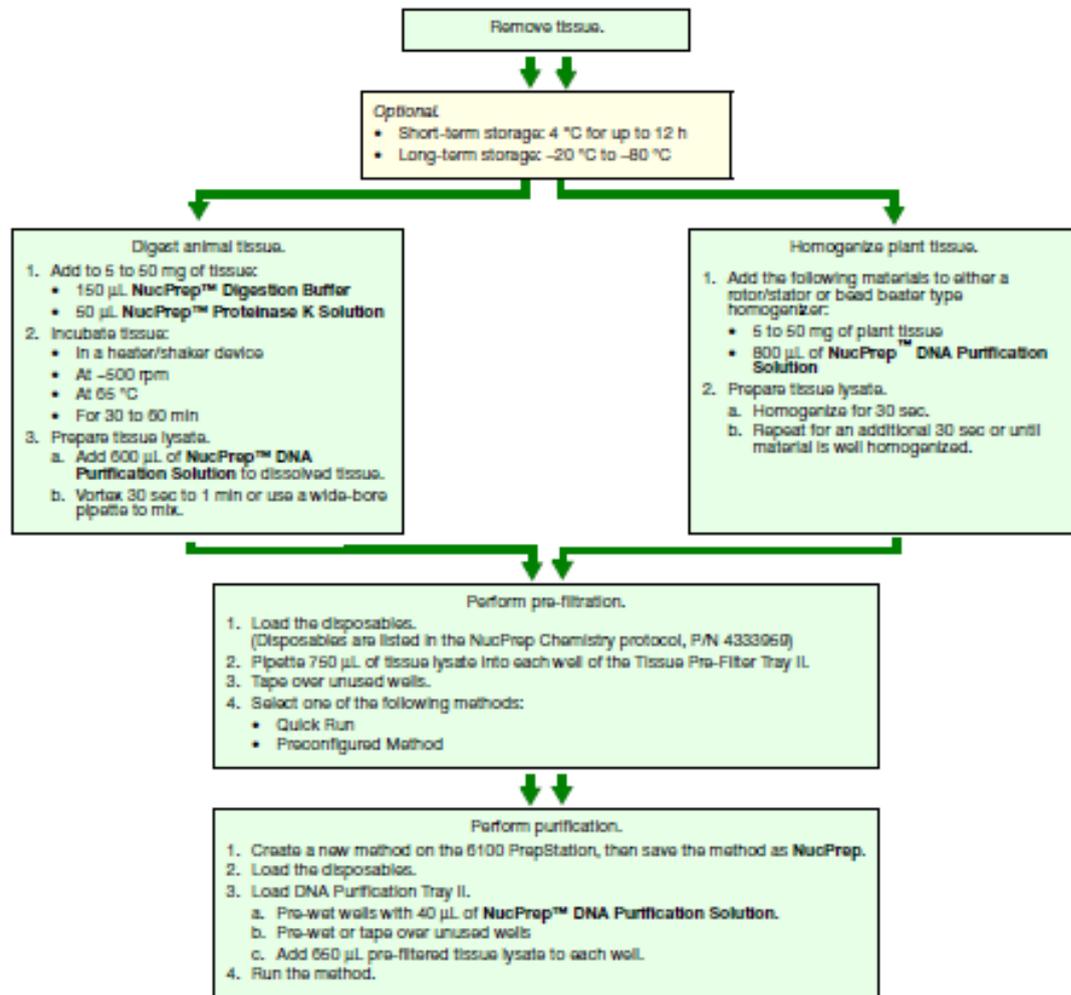


Mapa 8 – Cave;

Anexo 2 – Protocolo de extracção de ADN do extractor semi-automático *ABI Prism 6100™ PrepStation*.

NucPrep™ Chemistry Isolation of gDNA Quick Reference Card
Chemistry on the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation

⚠ WARNING Biological samples have the potential to transmit infectious disease. For safety and biohazard guidelines, refer to the "Safety" section in the NucPrep™ Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue Protocol, P/N 4333050. Follow specific safety practices when using this instrument. For each chemical in **bold** type below, read the MSDS and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.



Reagents and Consumables

Item	Part Number	Item	Part Number
15- and 50-mL sterile tubes (for example, BD Falcon)	MLS*	DNA Purification Tray II	4330172
Wide-bore pipette tips	MLS	NucPrep™ Proteinase K Solution	4333793
96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (also called "archive plate," "PCR plate," and "reaction plate")	4305737	NucPrep™ Digestion Buffer	4333800
		NucPrep™ DNA Purification Solution	4333802
Deep-well plate	4308041	NucPrep™ DNA Wash Solution	4333795
Splash guard	4311758	NucPrep™ DNA Elution Solution 1	4333794
Tissue Pre-Filter Tray II	4330888	NucPrep™ DNA Elution Solution 2	4333798

*Major laboratory supplier.



NucPrep™ Chemistry Isolation of gDNA Quick Reference Card

Chemistry on the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (continued)

⚠ WARNING Biological samples have the potential to transmit infectious disease. For safety and biohazard guidelines, refer to the "Safety" section in the NucPrep™ Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue Protocol, P/N 4333950. Follow specific safety practices when using this instrument. For each chemical in bold type below, read the MSDS and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

STEP	ACTION																																																																																									
1	Prepare sample	<p>a. Digest animal tissue.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Add 5 to 50 mg of tissue to a microcentrifuge tube or deep-well plate. 2. Add 150 µL NucPrep Digestion Buffer and 50 µL NucPrep Proteinase K Solution. 3. Incubate the tissue in a heater/shaker device at ~500 rpm, at 65 °C, for 30 to 60 min. 4. Add 600 µL NucPrep DNA Purification Solution to the dissolved tissue. 5. Vortex 30 sec to 1 min or use a wide-bore pipette and pump-mix at least three times. <p>b. Homogenize plant tissue using either a rotor/stator or bead beater type homogenizer.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Add 5 to 50 mg of plant tissue and 600 µL of NucPrep DNA Purification Solution to the homogenizer. 2. Homogenize for 30 sec and repeat for an additional 30 sec or until material is well homogenized. 																																																																																								
2	Perform pre-filtration with Quick Run or use the Pre-filter preconfigured method	<p>a. Load disposables and tape over any unused wells.</p> <p>b. Add 750 µL digested tissue lysate/NucPrep DNA Purification Solution into each well of the Tissue Pre-Filter Tray II and perform pre-filtration.</p> <p>c. Pre-filtration using Quick Run is presented in the following table. See the NucPrep Chemistry protocol (P/N 4333950) for the Pre-filter preconfigured method.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>Description</th> <th>Position</th> <th>Time (sec)</th> <th>Vacuum (%)</th> <th>Action</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>From the main menu.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Press F1 (Quick)</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Enter values.</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">500</td> <td style="text-align: center;">60</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Observe the Tissue Pre-Filter Tray II to see if all material has passed through the filter.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="padding-left: 20px;">a. Repeat step 2 until all material has passed through.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="padding-left: 20px;">b. Stop the vacuum after all liquid has passed through all the wells.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Touch Off at Collection.</td> <td style="text-align: center;">Touch Off</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Perform Touch Off</td> </tr> </tbody> </table> <p>d. Clear the instrument by removing the Tissue Pre-Filter Tray II and the deep-well plate from the instrument.</p> <p>e. Save the deep-well plate for purification. If necessary, store it at 4 °C for up to 12 h or at -20 to -80 °C until needed.</p>	Step	Description	Position	Time (sec)	Vacuum (%)	Action	1	From the main menu.	—	—	—	Press F1 (Quick)	2	Enter values.	Collection	500	60	Press F1 (Start)	3	Observe the Tissue Pre-Filter Tray II to see if all material has passed through the filter.						a. Repeat step 2 until all material has passed through.						b. Stop the vacuum after all liquid has passed through all the wells.					4	Touch Off at Collection.	Touch Off	—	—	Perform Touch Off																																														
Step	Description	Position	Time (sec)	Vacuum (%)	Action																																																																																					
1	From the main menu.	—	—	—	Press F1 (Quick)																																																																																					
2	Enter values.	Collection	500	60	Press F1 (Start)																																																																																					
3	Observe the Tissue Pre-Filter Tray II to see if all material has passed through the filter.																																																																																									
	a. Repeat step 2 until all material has passed through.																																																																																									
	b. Stop the vacuum after all liquid has passed through all the wells.																																																																																									
4	Touch Off at Collection.	Touch Off	—	—	Perform Touch Off																																																																																					
3	Run the NucPrep chemistry method to purify the pre-filtered, digested, tissue lysate	<p>a. Create a new method for the NucPrep chemistry method. Enter the parameter values provided in the table below.</p> <p>b. Save the method as NucPrep.</p> <p>c. Load the disposables, placing a 96-well Optical Reaction Plate with Barcode in the collection compartment, a splash guard in the waste compartment, and the DNA Purification Tray II in the purification tray carriage, then secure the tray.</p> <p>d. Move the carriage to the waste position and lock it.</p> <p>e. Ensure that the highlighter is at step 1 of the NucPrep method.</p> <p>f. Pre-wet the wells of the DNA Purification Tray II, add the pre-filtered tissue lysate, then perform the washes and the elution as indicated below.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>Description</th> <th>Vol (µL)</th> <th>Position</th> <th>Incubation (sec)</th> <th>Vacuum (%)</th> <th>Time (Sec)</th> <th>Action</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Pre-wet the wells with NucPrep DNA Purification Solution.</td> <td style="text-align: center;">40</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>Add sample lysates.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Add NucPrep DNA Wash Solution.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">90</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Add NucPrep DNA Wash Solution.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">90</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Add NucPrep DNA Wash Solution.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">90</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Perform pre-elution vacuum.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>Touch Off at Waste.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>Add NucPrep DNA Elution Solution 1.†</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td style="text-align: center;">60</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>Add NucPrep DNA Elution Solution 2.†</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">60</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press F1 (Start)</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>Touch Off at Collection.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Perform Touch Off</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Failure to perform the 180-second incubation step at this point results in low yields of gDNA. †To obtain the correct pH for the final sample, equal volumes of NucPrep DNA Elution Solution 1 and NucPrep DNA Elution Solution 2 MUST be used.</p> <p>g. Clear the instrument.</p> <p>h. Save the 96-well Optical Reaction Plate (archive plate containing gDNA). Store it at -15 to -25 °C until needed.</p>	Step	Description	Vol (µL)	Position	Incubation (sec)	Vacuum (%)	Time (Sec)	Action	—	Pre-wet the wells with NucPrep DNA Purification Solution .	40	Waste	—	—	—	—	1	Add sample lysates.	650	Waste	0	100	180	Press F1 (Start)	2	Add NucPrep DNA Wash Solution .	650	Waste	0	100	90	Press F1 (Start)	3	Add NucPrep DNA Wash Solution .	650	Waste	0	100	90	Press F1 (Start)	4	Add NucPrep DNA Wash Solution .	650	Waste	0	100	90	Press F1 (Start)	5	Perform pre-elution vacuum.	—	Waste	—	100	180	Press F1 (Start)	6	Touch Off at Waste.	—	Waste	—	—	—	Press F1 (Start)	7	Add NucPrep DNA Elution Solution 1.†	100	Collection	180	60	180	Press F1 (Start)	8	Add NucPrep DNA Elution Solution 2.†	100	Collection	0	60	180	Press F1 (Start)	9	Touch Off at Collection.	—	Collection	—	—	—	Perform Touch Off
Step	Description	Vol (µL)	Position	Incubation (sec)	Vacuum (%)	Time (Sec)	Action																																																																																			
—	Pre-wet the wells with NucPrep DNA Purification Solution .	40	Waste	—	—	—	—																																																																																			
1	Add sample lysates.	650	Waste	0	100	180	Press F1 (Start)																																																																																			
2	Add NucPrep DNA Wash Solution .	650	Waste	0	100	90	Press F1 (Start)																																																																																			
3	Add NucPrep DNA Wash Solution .	650	Waste	0	100	90	Press F1 (Start)																																																																																			
4	Add NucPrep DNA Wash Solution .	650	Waste	0	100	90	Press F1 (Start)																																																																																			
5	Perform pre-elution vacuum.	—	Waste	—	100	180	Press F1 (Start)																																																																																			
6	Touch Off at Waste.	—	Waste	—	—	—	Press F1 (Start)																																																																																			
7	Add NucPrep DNA Elution Solution 1.†	100	Collection	180	60	180	Press F1 (Start)																																																																																			
8	Add NucPrep DNA Elution Solution 2.†	100	Collection	0	60	180	Press F1 (Start)																																																																																			
9	Touch Off at Collection.	—	Collection	—	—	—	Perform Touch Off																																																																																			

© Copyright 2007, Applied Biosystems. All rights reserved. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Applied Biosystems is a registered trademark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the U.S. and certain other countries. ABI (design), Applied and NucPrep are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the U.S. and certain other countries.

P/N 4330432 Rev. A