

*Maria Alice Neves*

**Caracterização ecológica, fisiológica e genética de *Agaricus blazei* Murrill  
através de estirpes provenientes de diferentes empresas de produção de  
cogumelos**

Florianópolis  
2000

*Maria Alice Neves*

**Caracterização ecológica, fisiológica e genética de *Agaricus blazei* Murrill  
através de estirpes provenientes de diferentes empresas  
de produção de cogumelos**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
visando a obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Margarida Matos de  
Mendonça

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clarice Loguercio  
Leite

Florianópolis  
2000

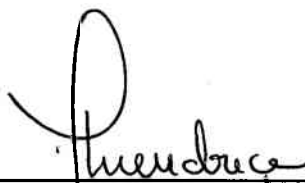
**"CARACTERIZAÇÃO ECOLÓGICA, FISIOLÓGICA E GENÉTICA  
DE *Agarius blazei* MURRILL ATRAVÉS DE ESTIRPES PROVENIENTES  
DE DIFERENTES EMPRESAS DE PRODUÇÃO DE COGUMELOS"**

**POR**

**MARIA ALICE NEVES**

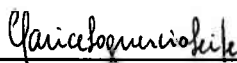
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pela Orientadora e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



---

**Profa. Dra. Margarida Matos de Mendonça**  
**Orientadora - MIP/CCB/UFSC**



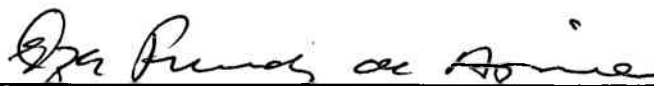
---

**Profa. Dra. Clarice Loguercio Leite**  
**Co-orientadora - BOT/CCB/UFSC**



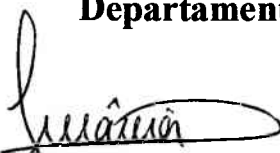
---

**Profa. Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya**  
**Departamento de Microbiologia/UFV**



---

**Profa. Dra. Elza Fernandes Araújo**  
**Departamento de Microbiologia/UFV**



---

**Prof. Dr. Artur Smânia Júnior - MIP/CCB/UFSC**  
**Coordenador do Programa de**  
**Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

**Florianópolis, outubro de 2000**

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão à Professora Margarida pela orientação, dedicação e apoio dispensados durante a realização deste trabalho

À Clarice, pelo apoio constante, e que é, para mim, mais do que professora

Aos meus pais e meus irmãos que sempre me deram apoio e valorizaram meu trabalho

Ao Sérgio que, mesmo distante, sempre esteve comigo

Às Professoras Catarina e Elza e ao Professor Marcos, pelo auxílio e contribuições a este trabalho e pelo acolhimento caloroso em Viçosa

À Alexandra, colega e amiga para todas as horas

Ao Silas e ao Zeca, pela amizade; ao Sidney, pelo companheirismo e realização das análises estatísticas; e ao Professor Marcelo dos Reis pela grande ajuda nas correções

Ao Nelson e ao Eustáquio, pelas mensagens e inúmeras informações trocadas

Aos amigos Olinto, Maurício, Denise, Marcos, Júpiter, Luciana e Tânia: não tenho palavras para agradecer, vocês foram especialmente importantes na execução deste trabalho

Aos colegas de laboratório André, Rogério e Jean, que torceram por este trabalho

Aos amigos Kérley, Pilar Ximena, Gilmara, Guilherme, Ireninha, Marcelo, João Júlio, Leila, Adalgisa, Patrícia, Simone, João Batista, Moema, Adalberto, Francilina, Maurílio, Lydice, André, Francis, Henrique, Marcelli, Tânia, Adelino e Silvia, pelos momentos vividos

Ao Dr. Danny Rinker (University of Guelph, Canadá) e ao Dr. John Bisset (Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Canadá), por identificarem a amostra de *Trichoderma*

Ao Professor Márcio e ao Marcos, do Departamento de Biologia Celular da UFSC, com quem iniciamos alguns testes de atividade

À Tech Paper (do Cacá) pelos excelentes serviços prestados

Ao João Santana, da PG em Biotecnologia, nosso assessor para assuntos burocráticos

Ao Sr. Lourenço, que gentilmente emprestou suas instalações para a realização do experimento de produção, e ao Genuir, seu caseiro

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realizar este curso

Ao Departamento de Microbiologia, BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, pela chance de tornar este trabalho possível e melhor

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro

Ao Fundo Bunka de Pesquisa / Banco Sumitomo, por acreditar e incentivar esta pesquisa

Muito obrigada a todos que me ajudaram a chegar até aqui

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	ii
SUMÁRIO .....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS .....	v
RESUMO .....	vii
SUMMARY .....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
<b>CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica.</b>	
Aspectos taxonômicos, identificação e ciclo de vida.....	4
Fatores de produtividade.....	5
Cultivo de <i>Agaricus blazei</i> .....	10
<b>CAPÍTULO 2 - Identificação de <i>Agaricus blazei</i> Murrill a partir de basidiomas obtidos de diferentes estirpes de “cogumelo do sol”. Estudo de culturas.</b>	
<b>Introdução</b> .....	13
<b>Material e métodos</b>	
Produção de inoculante a partir das culturas.....	16
Produção do substrato de cultivo .....	16
Preparo da camada de cobertura.....	17
Instalação do experimento e manejo .....	17
Coleta dos basidiomas e isolamento .....	18
Análise taxonômica.....	19
Estudo de culturas .....	19
<b>Resultados e discussão</b>	
Descrição dos basidiomas .....	20
Caracterização das culturas .....	26
<b>Conclusões</b> .....	28
<b>CAPÍTULO 3 - Efeito das condições ambientais no crescimento vegetativo de estirpes de <i>Agaricus blazei</i> Murrill provenientes de diferentes empresas</b>	
<b>Introdução</b> .....	29
<b>Material e métodos</b>	
Crescimento em diferentes meios de cultura e temperaturas .....	30
Crescimento em diferentes pH .....	31
Crescimento em composto comercial .....	31

<b>Resultados e discussão</b>	
Efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento .....	32
Efeito do pH no crescimento .....	37
Avaliação do crescimento micelial em composto comercial .....	39
<b>Conclusões</b> .....	43
<b>CAPÍTULO 4 - Características fisiológicas e genéticas de estirpes de <i>Agaricus blazei</i> Murrill provenientes de diferentes empresas</b>	
<b>Introdução</b> .....	44
<b>Material e métodos</b>	
Perfil e atividade enzimática de estirpes de <i>A. blazei</i> em composto .....	45
Variabilidade genética de estirpes de <i>A. blazei</i> utilizando-se as técnicas de PCR-RFLP e RAPD .....	48
Extração de DNA total .....	48
Amplificação por PCR e análise por RFLP .....	48
Análise do DNA por RAPD .....	49
<b>Resultados e discussão</b>	
Perfil e atividade enzimática de <i>A. blazei</i> .....	50
Análise genética	
PCR-RFLP da região ITS .....	51
RAPD .....	54
<b>Conclusões</b> .....	56
<b>CAPÍTULO 5 - Avaliação preliminar da produtividade de estirpes de <i>Agaricus blazei</i> Murrill e obtenção de basidiomas em sistema de cultivo experimental</b>	
<b>Introdução</b> .....	57
<b>Material e métodos</b> .....	59
<b>Resultados e discussão</b> .....	59
<b>Conclusões</b> .....	61
CONCLUSÕES GERAIS .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ANEXOS	

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

1. Massa seca média e altura média dos basidiomas obtidos a partir do cultivo de cada estirpe.....22

### Capítulo 4

1. Seqüência de bases dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região ITS do rDNA .....49
2. Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, com as respectivas seqüências de bases..... 50
3. Perfil enzimático e atividade das seis estirpes comerciais de *A. blazei*..... 51
4. Matriz de dissimilaridade genética entre as seis estirpes de *A. blazei*..... 55

### Capítulo 5

1. Índices de produtividade e eficiência biológica (em %) obtidos em cultivo experimental protegido de seis estirpes comerciais de *A. blazei* ..... 60

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

1. Basidioma de *A. blazei* (#34) produzido em Ratoles em 26/04/2000 .....22
2. *A. blazei*: a. himênio de basidioma maduro com basídios tetraspóricos; b. himênio de basidioma jovem com basidiolos e cistídios; c. esporos; d. trama da lamela; e. hifas e fragmentos da cobertura do píleo; f. contexto prosenquimatoso .....23
3. Aspecto macroscópico da cultura de *A. blazei* (#22) em AEM, ao final de 7 dias de incubação a 25°C.....27
4. Crescimento médio das estirpes de *A. blazei* em meio AEM durante seis semanas .....27
5. Características microscópicas da cultura de *A. blazei*: a. hifas generativas de septo simples; b. hifas generativas fibuladas; c. hifas com cristais; d. hifas ampuliformes.....28

### Capítulo 3

1. Crescimento das seis estirpes de *A. blazei* ao longo do tempo em meio AEM (A) e em meio ABD (B), incubados a 20°C (a), 25°C (b), 28°C (d) e 30°C (e) .....34
2. Biomassa produzida pelas seis estirpes em meio AEM e em meio ABD após dez dias de incubação ..... 36
3. Efeito do nível de pH no diâmetro das colônias de *A. blazei* ..... 38
4. Biomassa produzida pelas seis estirpes nos níveis de pH 6,0, 7,0 e 8,0..... 38

5. Crescimento do micélio das seis estirpes de <i>A. blazei</i> em composto comercial, nove dias após a inoculação (a) e crescimento linear ao longo do tempo (b) .....	40
6. Relação entre o crescimento linear do micélio de <i>A. blazei</i> ao final de treze dias (barras) e a quantidade de ergosterol detectada (pontos) .....	41

#### Capítulo 4

1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA total de seis estirpes de <i>A. blazei</i> .....	52
2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação da região ITS do rDNA de seis estirpes de <i>A. blazei</i> .....	52
3. Eletroforese em gel de agarose 2,0% da clivagem da região ITS do rDNA de seis estirpes de <i>A. blazei</i> com as enzimas de restrição <i>Alu</i> I, <i>Hha</i> I e <i>Hinf</i> I .....	53
4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos de DNA amplificados com o uso dos oligonucleotídeos OPF 10, OPF 12 e OPF 13 para seis estirpes de <i>A. blazei</i> .....	54
5. Dendrograma obtido com base nas distâncias genéticas da Tabela 3 .....	55



## RESUMO

*Agaricus blazei* Murrill, o “cogumelo do sol”, é um fungo cujo cultivo vem-se expandindo no Brasil na última década devido às propriedades medicinais que apresenta e ao seu alto valor no mercado internacional. Dentre as propriedades mais pesquisadas encontra-se o efeito anti-oncogênico, resultante da ação potenciadora do sistema imune. A produção do país destina-se principalmente à exportação para o Japão, Estados Unidos, Canadá e Coréia do Sul, onde os cogumelos desidratados são comercializados como produto nutricional. Entretanto, apesar do crescente interesse na produção, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas envolvendo aspectos básicos desta espécie, tais como a taxonomia, a ecologia e a genética, assim como aspectos aplicados relacionados, como a caracterização das estirpes comerciais utilizadas nos cultivos no país. Sendo assim, seis estirpes comerciais de “cogumelo do sol” foram obtidas junto a diferentes empresas produtoras de cogumelos, e diversos parâmetros foram considerados para avaliar a variabilidade intraespecífica e caracterizar quanto à taxonomia, ecologia, fisiologia e genética destas estirpes. Foram obtidos, em cultivo experimental, basidiomas das estirpes selecionadas visando a sua identificação e caracterização da espécie. As características observadas permitiram identificar os basidiomas como sendo *A. blazei*. Além disso, as culturas foram caracterizadas, sendo este o primeiro trabalho científico com a descrição de culturas desta espécie. Em seguida, as estirpes foram avaliadas *in vitro* quanto ao crescimento micelial em dois meios de cultura (ágar extrato de malte e ágar batata dextrose), incubados em quatro temperaturas (20°C, 25°C, 28°C e 30°C), em composto comercial, assim como em meio mínimo com pH ajustado para três níveis (6,0; 7,0 e 8,0). Foi determinado ainda o perfil enzimático da espécie e analisada a atividade enzimática, visando a diferenciação das estirpes. Análises genéticas utilizando a técnica de RFLP da região ITS do DNA ribossômico e a técnica de RAPD também foram realizadas. Finalmente, foi montado um cultivo experimental para a obtenção de basidiomas e avaliação preliminar de produtividade de cada estirpe. Foi possível detectar a existência de variabilidade, sendo que a estirpe #22 diferenciou-se das restantes (#21, #23, #24, #33 e #34) apresentando um crescimento mais lento nos diferentes substratos e temperaturas. A avaliação da atividade enzimática não possibilitou diferenciar as estirpes, entretanto este é o primeiro trabalho científico onde o perfil enzimático desta espécie é apresentado. As enzimas produzidas pela espécie em composto foram lacase, peroxidase, manganês peroxidase e celulasas. A análise molecular por RAPD sugeriu a existência de um baixo polimorfismo para as seis estirpes estudadas, sendo que a estirpe #22 foi a que apresentou a maior distância genética (cerca de 12%). O experimento preliminar de cultivo apresentou resultados baixos de produtividade, fato resultante de controle ambiental e manejo inadequados. Os resultados obtidos sugerem que apenas uma estirpe vem sendo comercializada no país, evidenciando a importância das pesquisas envolvendo estirpes comerciais, particularmente aspectos relacionados à seleção e ao melhoramento destas estirpes. Estes resultados poderão contribuir para o aprimoramento do sistema de produção de *A. blazei* fornecendo subsídios para o desenvolvimento de metodologias laboratoriais para a seleção de estirpes. Além disso, a aplicação prática destes resultados, observando as condições ótimas de temperatura, substrato e pH para cada estirpe, possibilitam um aumento na produtividade dos cultivos.

## SUMMARY

*Agaricus blazei* Murrill, known as “cogumelo do sol” in Brazil, is a fungus which cultivation has been increased in Brazil in the last decade due to its medicinal properties and the great economic value it reaches in the international market. Among the most studied properties is the antitumor effect that results from the immunopotential action. *Agaricus blazei* produced in Brazil is exported mainly to Japan, United States, and South Korea, where dried basidioms are commercialized as nutraceutical products. However, besides the great interest in production, few researches had been performed involving basic aspects of this species, as its taxonomy, ecology, and genetic, thus as other applied aspects, as the characterization of the commercial strains used in the cultivation. Six commercial strains of “cogumelo do sol” were obtained from different mushroom growers. Some parameters were considered to evaluate intraspecific variability and to characterize these strains according to taxonomy, ecology, physiology, and genetic. Basidioms from these strains were obtained from experimental cultivation to be identified and to characterize the species. Characteristics observed allowed to identify the basidioms as *A. blazei*. Besides, cultures of this fungus were characterized for the first time. The strains were evaluated *in vitro* regarding to mycelial growth in two culture media (malt extract agar and potato dextrose agar), incubated at four temperatures (20°C, 25°C, 28°C, and 30°C), in commercial compost, and in basic medium with three pH values (6,0; 7,0 and 8,0). The enzymatic profile of this species was determined and the enzymatic activity was evaluated to differentiate the strains. Genetic analyses using RFLP from ribosomal DNA and the RAPD technique were also made. Finally, an experimental cultivation was performed to obtain basidioms and to preliminarily evaluate the productivity of these strains. It was possible to identify variability. Strain #22 differentiated from others (#21, #23, #24, #33, and #34) showing slower growth at different substrates and temperatures tested. Enzymatic activity was similar among the strains, meanwhile this is the first scientific work presenting the enzymatic profile of this species. Enzymes produced in compost were laccase, peroxidase, manganese peroxidase, and cellulase. RAPD analysis suggested a low polymorphism between these strains. Strain #22 presented the great genetic distance (almost 12%). Preliminary cultivation result in low productivity due to inadequate management. Results obtained suggests that there is only one commercial strain being used in Brazil, making clear the need of researches involving commercial strains, specially involving aspects related to strain selection and improvement. These results can contribute to the improvement of the *A. blazei* cultivation providing grants to the development of laboratorial methodologies to strain selection. Besides, the practical application of these results, observing the optimal conditions of temperature, substrate, and pH to each strain, make possible an increase in the productivity of the cultivations.

## INTRODUÇÃO

A produção de cogumelos comestíveis e medicinais no Brasil ainda é uma atividade incipiente e com pouca repercussão mundial. Entretanto, o país tem um grande potencial para aumentar a sua produção porque dispõe de uma grande diversidade de resíduos agro-industriais adequados para a formulação de substratos, tem uma grande variedade de climas e dispõe de uma das dez maiores biodiversidades do planeta, certamente incluindo um número elevado de espécies de fungos com potencial para uso comestível e/ou medicinal.

A produção e o consumo de cogumelos no país vem crescendo nos últimos anos sobretudo devido à divulgação do seu valor nutricional e das propriedades medicinais. No entanto, a produção resulta sobretudo de atividade de pequenos produtores rurais que geralmente utilizam sistemas de baixa tecnologia e conseqüentemente com baixas produtividades. Existem poucas empresas com produção expressiva e a maioria não desenvolve todas as etapas do processo de produção, ou seja, produção de composto, de inoculante e de cogumelos, e geralmente a comercialização é realizada por meio de intermediários. Sendo assim, as estatísticas de produção e de exportação de cogumelos no país não estão disponíveis, e o problema pode ser devido à forma como as remessas do produto são registradas, sendo freqüentemente incluídas em rubricas não específicas, e também à informalidade do processo de produção e comercialização.

No contexto nacional o estado de Santa Catarina tem uma produção de cogumelos inexpressiva. Entre 1995 e 1996, registro disponível mais recente, o estado produziu apenas 4,5% da produção nacional, enquanto São Paulo, o maior produtor nacional, contribuiu com 80% da produção total. Apesar disso, Santa Catarina tem grande potencial para a atividade devido à diversidade e quantidade de resíduos agro-industriais disponíveis. Além disso o clima é favorável, propiciando o cultivo de espécies de regiões temperadas, cujas tecnologias de produção estão melhor definidas, assim como de espécies de regiões subtropicais, o que possibilita a exploração de espécies diferentes e a produção continuada durante o ano.

As espécies de cogumelos mais produzidas no país não são nativas, tendo destaque *Agaricus brunnescens* Peck [= *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach], o *champignon de Paris*, a espécie comestível mais cultivada mundialmente, e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, o *shiitake*, que ocupa a segunda posição no país e a terceira no contexto mundial quando se considera o volume de produção. *L. edodes* tem importância não só por suas qualidades nutricionais, mas também pelas propriedades medicinais que apresenta, como anti-oncogênica, anti-viral e reguladora da pressão sangüínea, entre outras (WASSER & WEISS, 1999).

Por outro lado, espécies de *Pleurotus* (Fr.) Quél., um gênero de distribuição cosmopolita ocorrendo também em diversas regiões brasileiras, vêm sendo cultivadas no país desde o final da década de 80. As espécies deste gênero foram as que mais cresceram em termos de produção mundial, tais como *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. e *P. sajor-caju* Fr.: Fr. entre outras, apresentando um incremento de mais de 400% entre 1986 e 1991, ocupando atualmente o segundo lugar na produção mundial de cogumelos. Este aumento ocorreu devido à facilidade do seu cultivo, realizado em substratos pasteurizados e utilizando técnicas que viabilizam o uso de sacos plásticos para o cultivo, fato que contribuiu para aumentar a capacidade de conversão de substrato. Além disso, as espécies têm sabor muito apreciado e apresentam propriedades nutricionais e medicinais comprovadas cientificamente (GUNDE-CIMMERMAN, 1999).

No final de década de 90, o cultivo de um fungo denominado popularmente como “cogumelo do sol” se expandiu em diversas regiões do país, e surgiu como fonte de renda alternativa para pequenos e médios produtores rurais devido ao alto preço no mercado internacional. No entanto, duas espécies, *Agaricus blazei* Murrill e *Agaricus silvaticus* Schaeffer, vêm sendo comercializadas no Brasil sob o mesmo nome coloquial e com a mesma finalidade. *A. blazei* tem sido bastante estudada com relação às suas propriedades medicinais. Esta espécie foi identificada pela primeira vez na Flórida, EUA, ocorrendo também em pradarias na região sudeste do Brasil (MURRILL, 1943; HEINEMANN, 1993). No Japão, maior importador deste cogumelo, é conhecida popularmente como “himematsutake” ou “kawariharatake” (IWADE & MIZUNO, 1994).

O interesse na produção de *A. blazei* reside na possibilidade de exploração de suas propriedades medicinais, principalmente a atividade anti-oncogênica. Experimentos realizados em laboratório mostraram que extratos de *A. blazei* apresentaram ação anti-oncogênica, sendo a substância responsável por esta atividade um polissacarídeo presente na parede, o  $\beta$ -glucano (MIZUNO *et al.*, 1999). Além disso, foram detectadas também ações regulatórias do açúcar sanguíneo e redução de colesterol (KAWAGISHI *et al.*, 1988; MIZUNO, 1995), assim como ação antibacteriana e antiviral (OSAKI *et al.*, 1994). Este cogumelo ainda apresenta potencial para ser utilizado paralelamente aos tratamentos tradicionais de radio e quimioterapia, diminuindo os seus efeitos deletérios, o que sugere uma ação antimutagênica (DENADAI *et al.*, 1998).

Face às propriedades medicinais de *A. blazei* e, conseqüentemente, ao valor do produto no mercado internacional, o interesse pelo seu cultivo no estado de SC vem crescendo significativamente, visando a exportação principalmente para o Japão e Estados Unidos. Entretanto, a produção não tem crescido na mesma proporção que o número de produtores envolvidos na atividade, visto que a maioria dos cultivos resulta em baixa produtividade, o que

leva o produtor à desistência. A produtividade insatisfatória dos cultivos de *A. blazei* é resultante da falta de conhecimento tecnológico por parte dos produtores e ocorre basicamente por três razões. A primeira reside na dificuldade de obtenção de substrato adequado para o cultivo, o composto, sendo que a maioria dos produtores de composto utiliza formulações adaptadas do cultivo de *A. brunnescens*, sem otimizar a produção com o uso de resíduos locais e sem compatibilizar as características do composto com a estirpe de *A. blazei*. A segunda razão é a falta de conhecimento das técnicas básicas de cultivo e manejo, também com freqüente adaptação daquelas utilizadas no cultivo de *A. brunnescens*, uma espécie típica de regiões temperadas e com sistema de produção diferente. Finalmente, o desconhecimento da origem e das características das diversas estirpes de *A. blazei* utilizadas comercialmente, dificulta o processo de seleção daquelas mais eficientes para as condições de cultivo de cada região.

Pesquisas envolvendo a avaliação da variabilidade de estirpes comerciais foram desenvolvidas com diversas espécies de cogumelos, como *A. brunnescens* (HORNA & ROYSE, 1983; XU *et al.*, 1997), *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) Singer (REYES *et al.*, 1998) e *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (MATSUMOTO & FUKUMASA-NAKAI, 1995), visando o aumento da produtividade por meio da seleção de estirpes mais adaptadas a determinadas condições ambientais ou substratos. Estas pesquisas possibilitam uma diminuição no custo de produção e propiciam a produção de cogumelos durante um período mais longo com a utilização de diversas estirpes dependendo da temperatura da região ou da época do ano.

As características das estirpes de *A. blazei*, do substrato e o manejo ambiental do cultivo, são os principais fatores determinantes da produtividade e eficiência biológica do cultivo e da qualidade dos cogumelos produzidos. Face à escassez de informações sobre a proveniência e as características das estirpes de *A. blazei* utilizadas no país, o objetivo deste trabalho foi definir parâmetros para a avaliação de variabilidade intraespecífica de *A. blazei*, possibilitando caracterizar as estirpes utilizadas em cultivos no país. Sendo assim, a realização deste trabalho deu-se em duas etapas: a primeira envolveu a obtenção de basidiomas de “cogumelo do sol” para a realização da identificação com *A. blazei*, a segunda foi o estudo de características que permitissem avaliar a variabilidade das estirpes desta espécie.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar taxonomicamente basidiomas obtidos de estirpes de “cogumelo do sol” provenientes de diferentes empresas de produção de cogumelos

Identificar parâmetros ecológicos, fisiológicos e genéticos que permitam detectar a variabilidade intraespecífica de *A. blazei*

Avaliar preliminarmente a produtividade de diferentes estirpes de *A. blazei* em dois sistemas de cultivo protegidos e produzir basidiomas para a identificação taxonômica

## CAPÍTULO 1

### Revisão bibliográfica

#### 1 Aspectos taxonômicos, identificação e ciclo de vida

O gênero *Agaricus* é classificado na tribo Agariceae, família Agaricaceae, ordem Agaricales, classe Basidiomycetes, tendo sido descrito pela primeira vez em 1821 na revista *Systema Mycologicum* por Fries. Este gênero compreende cerca de 200 espécies, as quais estão distribuídas em sete seções: *Agaricus*, *Sanguinolenti*, *Arvenses*, *Xanthodermei*, *Hortenses*, *Bitorques* e *Minores*, que são separadas basicamente de acordo com o tipo de anel formado após a ruptura do véu e o tipo de reação de coloração do tecido quando em contato com hidróxido de potássio ou quando friccionado (SINGER, 1975; ARORA, 1986; HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

*Agaricus blazei* pertence à seção *Arvenses* e foi descrita pela primeira vez por MURRILL, em 1945. O basidioma, ou cogumelo, caracteriza-se por apresentar um píleo sub-cilíndrico a sub-expandido, medindo de 5 a 11 centímetros de diâmetro, com coloração de creme a ocre e pequenas escamas mais claras. O estipe é branco tornando-se amarelado quando friccionado, apresenta espessura constante e tem vestígios do véu parcial (anel), o qual é esbranquiçado com pequenos flocos amarelados na face inferior. O contexto é branco, tornando-se de amarelo a laranja quando friccionado e dourado-fosco quando seco. A esporada, impressão dos esporos em papel, é de cor marrom-chocolate e os esporos são lisos e elípticos, com dimensões variando de 4,9 a 6,4 por 4,0 a 4,7  $\mu\text{m}$  (MURRILL, 1945; FREEMAN, 1979; HEINEMAN, 1993).

O espécime descrito por Murrill em 1945 foi coletado em Gainesville, na Flórida, por R. W. Blaze, razão pela qual o epíteto específico é *blazei*. O tipo encontra-se depositado no Herbário da Universidade da Flórida (FLAS) (MURRILL, 1945). Mais recentemente, FREEMAN (1979) publicou uma descrição baseada em espécimes coletados na mesma região onde foi encontrado o tipo (FREEMAN, 1979). Os primeiros espécimes encontrados no Brasil foram coletados em Piedade, São Paulo, no final da década de 70, por um pesquisador japonês que posteriormente cultivou *A. blazei* com o objetivo de produzir cogumelos. Nesta mesma época, algumas culturas foram enviadas ao Japão onde se iniciaram os estudos acerca das suas propriedades medicinais. A espécie foi cultivada no Japão, mas na década de 90 algumas

matrizes retornaram ao Brasil e desde então têm sido utilizadas nos cultivos. O primeiro material brasileiro incluído em uma descrição foi citado por HEINEMANN em 1993.

*Agaricus blazei* é uma espécie encontrada naturalmente em áreas de pradaria, descampadas, ocorrendo em ambientes de clima subtropical úmido, com temperaturas oscilando entre 25 e 30°C (MURRILL, 1945; FREEMAN, 1979; HEINEMAN, 1993). A espécie é saprófita e pode ser cultivada em substratos ligno-celulósicos, como mistura de palha com esterco. As espécies com hábito semelhante ao de *A. blazei* são consideradas “decompositoras de palha” ou celulolíticos, tendo capacidade de decompor tanto a celulose como a lignina. Como a palha tem um conteúdo alto de lignina, isto pode ter sido um reflexo da pressão seletiva nestas espécies, possibilitando a colonização da palha por estes fungos (TANESAKA, MASUDA & KINUGAWA, 1993). Esta característica tem um impacto importante nos estudos aplicados, já que a lignina é um composto de estrutura complexa e, portanto, de difícil degradação (ORTH, ROYSE & TIEN, 1993; SCHOEMAKER & PIONTEK, 1996).

Em geral, a maior parte do ciclo de vida dos fungos ocorre na forma de micélio vegetativo. Durante esta fase ocorre a decomposição e absorção de nutrientes que possibilitam a formação dos basidiomas, as estruturas reprodutivas. O ciclo de vida de *A. blazei* tem início quando um basidioma maduro, cujo himênio é exposto, libera basidiósporos no ambiente, os quais germinam dando origem a hifas haplóides que constituirão o micélio primário. Quando dois micélios primários diferentes entram em contato, ocorre a plasmogamia, que resulta em hifas dicarióticas que formarão o micélio secundário. Esta fase continuará até que um estímulo, tal como variações térmicas, de umidade ou condições de estresse, induza a produção de cogumelos para voltar à fase reprodutiva, reiniciando o ciclo (ALEXOPOULOS, MIMS, BLACKWELL, 1996).

## 2 Fatores de produtividade

A produtividade de um cultivo de cogumelos depende de três fatores interligados que envolvem a composição do substrato ou composto, as técnicas de manejo do cultivo e das condições ambientais e as características da espécie e da estirpe selecionada. O micélio fúngico tem um contato íntimo com o substrato no qual se desenvolve, portanto o substrato tem um papel importante no cultivo, devendo conter os nutrientes necessários para o crescimento do micélio, garantindo a seletividade do substrato para que o micélio desenvolva-se uniformemente, impedindo ainda o desenvolvimento de contaminantes que venham a competir com o *Agaricus*. Os fatores químicos e físicos do composto também devem ser monitorados, particularmente a relação C/N, a umidade e o teor de amônia (RINKER, 1993). Para *A. blazei* a relação C/N do

composto ainda não foi definida, sendo que não existem pesquisas demonstrando qual a faixa ideal para as diversas estirpes. EGUCHI, YOSHIMOTO & HIGAKI (d.n.<sup>1</sup>) verificaram que a razão C/N que proporcionou a melhor produtividade para a estirpe CJ-01 foi de 45/1. No país a maioria do composto produzido dispõe de uma razão em torno de 17/1 (BRAGA *et al.*, 1998), que é a relação utilizada para o cultivo de *Agaricus brunnescens* (Peck). A umidade deve estar em torno de 70%, com baixo teor de amônia e o pH ótimo determinado *in vitro* para esta espécie foi de 6,0 (EGUCHI *et al.*, 1994).

Por outro lado, para que o substrato mantenha as condições ideais para o crescimento de *Agaricus*, é necessário que o manejo do cultivo seja rigoroso quanto à manipulação das condições ambientais. A temperatura, umidade e ventilação devem ser controladas para que a superfície do substrato mantenha as características propícias para o crescimento do micélio de *Agaricus* e o desenvolvimento dos basidiomas, e estes parâmetros variam para cada fase do cultivo. O manejo inadequado destes fatores pode levar à anormalidades nos cogumelos e à queda na produtividade. Alterações bruscas na temperatura podem resultar em cogumelos com píleo rijo e o excesso de água próximo à fase de frutificação pode implicar na maturação prematura do cogumelo; o excesso de CO<sub>2</sub> na superfície da camada de cobertura pode provocar alongamento no estipe e desenvolvimento restrito do píleo, sendo que todas essas anomalias vêm acompanhadas de quedas na produtividade (HARVEY, WUEST & SCHISLER, 1982; RINKER, 1993).

O terceiro fator crítico para a produtividade do cultivo é a qualidade e a origem da estirpe utilizada. As estirpes apresentam características particulares que vão desde a cor e o tamanho dos cogumelos produzidos, o tempo de maturação e a resistência a patógenos, até a quantidade de substâncias com propriedades medicinais produzidas (RINKER, 1993). A capacidade da estirpe de manter uma baixa taxa de variação relacionada aos aspectos morfo-fisiológicos é a garantia de qualidade e produtividade daquela estirpe. Para manter as características das estirpes, estas devem ser propagadas vegetativamente em laboratório e conservadas adequadamente, evitando-se ao máximo o subcultivo. As culturas podem ser conservadas em meios nutricionalmente pobres, sob óleo mineral ou liofilizadas. No entanto, fungos filamentosos que são mantidos e subcultivados repetidamente em meios laboratoriais, exibem altos níveis de variação morfológica e fisiológica e uma alta frequência de instabilidade é frequentemente encontrada na ausência de qualquer agente mutagênico externo (ROYSE, 1982; LI *et al.*, 1994). Este fato ressalta a importância de serem identificadas as características das espécies em cultura, o que facilita o

---

<sup>1</sup> Data não disponível.



acompanhamento destas espécies em bancos de germoplasma que garantem a qualidade e a viabilidade das estirpes.

Em estudos realizados com *A. brunnescens*, observou-se que estirpes comerciais subcultivadas em laboratório por períodos prolongados apresentaram setorização espontaneamente, isto é, a cultura apresentou variações morfológicas decorrentes de variações genéticas em consequência de processos de adaptação ao meio de cultura. O micélio setorizado, quando utilizado na produção de inoculante, pode completar o ciclo de crescimento, mas o resultado é uma baixa produtividade do cultivo e qualidade inadequada dos cogumelos para comercialização. No caso específico de *A. brunnescens* existe um problema relacionado ao melhoramento de estirpes resultante da limitada diversidade genética existente nas estirpes utilizadas comercialmente, caracterizando este cultivo como uma monocultura, o que dificulta a seleção de novos fenótipos por meio de programas de melhoramento, tornando estas estirpes ainda mais frágeis e vulneráveis às doenças epidêmicas (JODON, ROYSE & JONG, 1982; LI *et al.*, 1994; BASTIDE *et al.*, 1997).

Existem dificuldades relacionadas ao melhoramento genético de *A. brunnescens* porque esta espécie tem um ciclo de vida secundariamente homotático, o que significa que um único basidiosporo apresenta mais de um núcleo, podendo se auto fertilizar dando origem a um micélio heterocariótico e que tem capacidade de produzir basidiomas, o que não ocorre em outras espécies de *Agaricus*. Esta característica restringe os cruzamentos e limita a troca genética entre populações e entre estirpes diferentes desta espécie (CASTLE, HORGAN & ANDERSON, 1988; XU *et al.*, 1997; STOOP & MOOIBROEK, 1999).

As estirpes de *A. blazei* que vêm sendo comercializadas no Brasil provêm de empresas diversas, mas a origem de cada estirpe não é clara. Alguns produtores afirmam que as estirpes brasileiras provêm de uma única origem, uma estirpe levada ao Japão e que retornou ao Brasil na década de 90. Por outro lado, algumas empresas divulgam que as estirpes que comercializam são exclusivas e provenientes de programas de seleção e melhoramento. Caso haja uniformidade genética ocorre um monocultivo, o que não é vantajoso, pois a espécie perde variabilidade, tornando-se mais vulnerável à competição, doenças, parasitismo e outras interações negativas (ODUM, 1988; BASTIDE *et al.*, 1997). No entanto, se houver variabilidade entre as diversas estirpes, é possível diferenciar e melhorar geneticamente as estirpes.

As técnicas mais empregadas para avaliar a variabilidade intraespecífica de estirpes envolvem aspectos ecológicos, fisiológicos e genéticos que são estudados a partir de culturas obtidas dos basidiomas. Estas técnicas evidenciam a variabilidade das estirpes, analisando características que vão desde a produção de determinadas enzimas (KLÁN & BAUDISOVÁ, 1992;

MATA, SAVOIE, DELPECH, 1997), análise do DNA (MATSUMOTO, MIMURA, FUKUMASA-NAKAI, 1995), o efeito da temperatura, do pH e do meio de cultura no crescimento vegetativo e na produção de biomassa (LONERGAN, JONES, MAINWARING, 1994; REESLEV & KJØLLER, 1995) até a produtividade da estirpe em substratos diversos (NOBLE, GROGAN, ELLIOTT, 1995).

A variabilidade ecológica intraespecífica pode ser avaliada através do estudo do efeito de diversos fatores ambientais no crescimento, assim como a análise do crescimento em diferentes substratos, temperaturas e pHs. Estes efeitos podem ser avaliados determinando-se a taxa de crescimento vegetativo, a produção de biomassa ou a produtividade da estirpe em um sistema experimental de produção. Dentre as técnicas diretas para avaliar a produção de biomassa em função das variações ambientais, pode-se citar as que determinam a taxa de crescimento micelial, a avaliação do crescimento radial e linear e a produção de biomassa em função do tempo (WIEGANT *et al.*, 1992; LONERGAN *et al.*, 1994; NOBLE *et al.*, 1995; REESLEV & KJØLLER, 1995; BASTIDE *et al.*, 1997). As técnicas indiretas de avaliação de biomassa podem envolver a detecção da atividade de lacase extracelular (MAU, BEELMAN & ZIEGER, 1992), a quantidade de ergosterol da massa micelial (MARTIN, DE LARUELLE, HILBERT, 1990; OKEKE *et al.*, 1997) ou a quantidade de glicosamina produzida (MAU *et al.*, 1992).

As diferenças nas taxas de crescimento evidenciam a capacidade de cada estirpe de crescer e se adaptar a determinadas condições ambientais. Várias espécies de fungos já foram caracterizadas segundo este critério, incluindo algumas espécies de cogumelos comestíveis, como *A. brunnescens*, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus subfloccosus* (Lange) Pilát. Estes resultados têm impacto direto no cultivo, pois estabelecem as condições mais apropriadas para o desenvolvimento do micélio e, conseqüentemente, para obtenção de maior produtividade (TAN & MOORE, 1992; WIEGANT *et al.*, 1992; NOBLE *et al.*, 1995; BOYLE, 1998).

O estudo fisiológico dos fungos com relação às enzimas produzidas envolve tanto a detecção de enzimas extracelulares como a identificação destas enzimas e avaliação de sua atividade. NOBLES (1948, 1958, 1965) definiu uma metodologia que permite caracterizar as culturas e detectar as enzimas extracelulares produzidas *in vitro*. Esta técnica permite detectar as enzimas produzidas pelas culturas, no entanto não permite identificá-las. Para complementar estas informações, outros testes bioquímicos foram propostos, além dos testes com meios ácidos propostos por Nobles, e estes permitem identificar as enzimas produzidas pelas culturas fúngicas, tais como lacase, citocromo oxidase, peroxidase e tirosinase (KÄÄRIK, 1965; HARKIN & OBST, 1973; TAYLOR, 1974; STALPERS, 1978). Enzimas extracelulares como lacase, peroxidase e celulase foram detectadas em *A. brunnescens* (TURNER, 1974; WOOD, 1980; BONNEN, ANTON, ORTH, 1994) e *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. (ROUX & LABARÈRE, 1990) que têm *habitat*

semelhante ao de *A. blazei*, ocorrendo naturalmente em pradarias, e cujo cultivo envolve substratos lignocelulósicos (IRAÇABAL, ROUX, LABARÈRE, 1991; MILES & CHANG, 1997).

O uso da biologia molecular é outra estratégia que pode ser utilizada para avaliar a diversidade em diversos níveis taxonômicos, e freqüentemente fornece informações acerca da variabilidade de estirpes de uma mesma espécie. A variabilidade genética nestas estirpes propicia a base necessária para o melhoramento e seleção de organismos que apresentem as características comercialmente desejadas, além de permitir o desenvolvimento de marcadores específicos, os quais podem proteger industrialmente a estirpe marcada. Dentre as metodologias que permitem estudar o polimorfismo genético das estirpes de uma mesma espécie fúngica está a análise de marcadores moleculares baseados no DNA, como RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). A caracterização genética usando marcadores moleculares baseados no DNA tem a vantagem de que estes marcadores não são suscetíveis à variação em função da idade e nem do tipo de material biológico utilizado para análise, assim como não apresentam influência das condições ambientais (NEALE *et al.*, 1992; ZERVAKIS & LABARÈRE, 1992; BERTINI *et al.*, 1998; CASTLE *et al.*, 1998).

As relações intra e interespecíficas em culturas fúngicas têm sido extensivamente analisadas através das seqüências de nucleotídeos dos espaçadores transcritos internos (ITS) e dos espaçadores intergênicos (IGS) do DNA ribossômico (rDNA) nuclear. Uma estratégia eficiente para verificar o polimorfismo em estirpes fúngicas é a análise do RFLP das regiões do DNA amplificadas por PCR, usando enzimas de restrição. Os marcadores RFLP possibilitam detectar diferenças específicas na seqüência de DNA que alteram o tamanho dos fragmentos obtidos a partir da digestão da seqüência amplificada com enzimas de restrição (HENRION, CHEVALIER, MARTIN, 1994; KRETZER *et al.*, 1996; JACOBS & REHNER, 1998).

Os estudos de polimorfismo entre estirpes, utilizando a técnica RFLP, demonstraram heterogeneidade nas seqüências IGS de *Pleurotus cornucopiae* (Paul.: Pers.) Roll. (IRAÇABAL & LABARÈRE, 1994). A análise genética do DNA mitocondrial (mtDNA) através dessa mesma técnica em *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., *L. edodes* (MATSUMOTO & FUKUMASANA-KAI, 1993; 1995) e *A. brunnescens* (XU *et al.*, 1997) evidenciou uma correlação entre a divergência genética e a distância geográfica das populações analisadas em cada espécie.

Outro tipo de marcador molecular é o RAPD-PCR. Nesta metodologia os fragmentos de uma pequena quantidade de DNA podem ser amplificados utilizando oligonucleotídeos com seqüência única e aleatória, de pequeno tamanho. O pareamento ocorre em diferentes regiões do genoma, ampliando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. A maioria dos oligonucleotídeos apresenta homologia a seqüências com baixo número de cópias no DNA.

Sendo assim, estes marcadores RAPD têm sido utilizados para caracterização molecular, estabelecimento da correlação molecular e variabilidade genética (WILLIAMS *et al.*, 1990; SCHÄFER, WÖSTEMEYER & RANDOM, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1993; JUNGHANS *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de marcadores moleculares específicos foi utilizado para a identificação de uma espécie de trufa, *Tuber borchii* Vittad., onde os pares de iniciadores (*primers*) selecionados foram seqüências não polimórficas de regiões gênicas da espécie e que permitiram a monitoração de todo o ciclo de vida deste fungo (BERTINI *et al.*, 1998). No caso de *A. brunnescens* as bandas produzidas por RAPD apresentaram polimorfismo entre as estirpes estudadas, demonstrando que são potenciais marcadores genéticos da espécie, o que propicia estudos de melhoramento e de caracterização (KHUSH, BECKER & WACH, 1992).

### 3 Cultivo de *Agaricus blazei*

O cultivo de *A. blazei* envolve diversas etapas, as quais foram adaptadas do cultivo de *champignon de Paris* e podem ser ordenadas da seguinte forma: obtenção ou preparo do inoculante ou *spawn*, preparo do composto, incluindo a compostagem (Fase I) e a pasteurização (Fase II), inoculação, incubação ou “corrida micelial”, colocação da camada de cobertura, produção, colheita e limpeza. O preparo do inoculante é uma etapa importante que requer condições rigorosas de assepsia. Neste processo, o micélio desenvolvido *in vitro* é transferido para um substrato esterilizado, geralmente à base de grãos, e a mistura dos grãos com o micélio é denominada de inoculante ou *spawn*. A qualidade do inoculante depende não só das técnicas de produção, mas também das características da estirpe. Após a colonização dos grãos pelo micélio fúngico, o inoculante deverá ser adicionado ao composto (RINKER, 1993; COLAUTO & EIRA, 1998, BRAGA *et al.*, 1998).

O composto é o substrato propício para o desenvolvimento do micélio e que é geralmente preparado por fermentação sólida, a compostagem, utilizando-se resíduos agro-industriais, durante a qual ocorre a degradação da matéria orgânica. Esta etapa é seguida de uma pasteurização, cujo objetivo é eliminar insetos, pragas e esporos de microorganismos contaminantes. A pasteurização é realizada sob condições ambientais controladas em local fechado, ao final da qual deve-se equilibrar a temperatura do substrato com a temperatura ambiental para então o inoculante ser misturado ao substrato tratado. As características que darão seletividade ao composto para o desenvolvimento do micélio do *Agaricus* são a relação entre a quantidade de carbono e nitrogênio, que para *A. brunnescens* deve estar em 17:1 no momento da inoculação, o pH, em torno de 7,5, e a quantidade de amônia no final da pasteurização, que não

deve superar 10 ppm. O período de crescimento vegetativo do micélio fúngico no composto é chamado de corrida micelial e geralmente ocorre em câmaras sem luz e com circulação de ar mínima (RINKER, 1993).

Dois sistemas de cultivo são tradicionalmente utilizados para *A. blazei* após o composto ter sido colonizado pelo micélio fúngico. O primeiro é desprotegido, a céu aberto, e simula as condições do *habitat* natural da espécie, e o segundo é protegido, realizado em ambiente fechado climatizado ou não. No primeiro caso o substrato colonizado é colocado diretamente em sulcos (canteiros) no solo e a camada de cobertura (*casing*) utiliza o próprio solo do local. São formados canteiros que ficam mais elevados do que o solo original, propiciando uma ventilação forçada entre os canteiros. No caso do cultivo protegido são utilizadas estufas plásticas ou de bambu e o solo da camada de cobertura é colocado sobre o composto miceliado uniformemente, nas bancadas internas à estufa (BRAGA *et al.*, 1998; BRAGA & EIRA, 1999).

A produtividade dos cultivos de *A. blazei* ainda é insatisfatória por falta de tecnologia adequada, e práticas alternativas vêm sendo propostas visando melhorar a sua produtividade (IWADE & MIZUNO, 1997; BRAGA, 1999; SÁNCHEZ-VAZQUÉZ, 1999). IWADE & MIZUNO (1997) desenvolveram uma técnica de cultivo protegido cujo objetivo foi melhorar o arejamento e a umidade nos canteiros de *A. blazei* em estufa. Para isto, os canteiros tiveram a camada de cobertura colocada em camalhões, dispostos no sentido da corrente de ar interna e pedras pequenas foram misturadas à camada de solo para melhorar a drenagem de água.

Outro sistema de cultivo, desenvolvido por SÁNCHEZ-VAZQUÉZ (1999), utilizou substratos em sacos plásticos que foram esterilizados em autoclave, em substituição ao processo de pasteurização tradicionalmente utilizado para espécies de *Agaricus*. Esta técnica, também utilizada em cultivos de *Pleurotus* spp. e de *L. edodes*, diminui a incidência de contaminantes aumentando a produtividade do cultivo.

Nos cultivos em que a camada de cobertura é utilizada, ela pode ser composta de materiais diversos, devendo ser desinfetada para prevenir o desenvolvimento de organismos contaminantes presentes na matéria-prima utilizada. Suas principais funções são induzir a formação de primórdios, dar suporte físico aos basidiomas, proporcionar uma superfície uniforme, regular a temperatura entre o substrato e o ambiente, reter água e fornecer água para o basidioma. Dentre os materiais utilizados nesta camada estão o solo mineral ou uma mistura de solo e turfa (COLAUTO & EIRA, 1998; BRAGA & EIRA, 1999). É importante verificar as características desta camada no sentido de propiciar aeração, pH e retenção de água adequados. O micélio também deverá colonizar esta camada e para que se inicie a formação dos primórdios, é importante

diminuir o nível de dióxido de carbono no ambiente através do aumento da ventilação, uma vez que altos níveis de CO<sub>2</sub> são inibidores da frutificação (REDDY & PATRICK, 1990; RINKER, 1993).

Além dos benefícios nutricionais e medicinais, o cultivo de cogumelos tem também um importante impacto ecológico, pois uma grande variedade de resíduos agro-industriais pode ser utilizada como substrato para a produção de espécies comestíveis e medicinais. Resíduos de substrato utilizado em cultivo de *L. edodes* e de *P. ostreatus* também podem ser aproveitados como substrato para outras espécies de fungos comestíveis, como *Pleurotus* e *Lyophyllum* Karsten cultivando-os em seqüência. Estes mesmos resíduos podem, ainda, ser usados na alimentação de ruminantes. O composto previamente degradado pelas enzimas fúngicas torna-se mais facilmente digerível por estes animais, além de conter mais açúcares livres e proteínas e menos celulose e lignina. Pelo menos três conseqüências positivas advêm destes estudos: o aumento da oferta de alimentos, a melhora do bem-estar humano e a redução da poluição ambiental (ROYSE, 1992; ADAMOVIC *et al.*, 1998; AKAMATSU, 1998; CHANG, 1999).

## CAPÍTULO 2

# Identificação de *Agaricus blazei* Murrill a partir de basidiomas obtidos de diferentes estirpes de “cogumelo do sol”. Estudo de culturas

### 1 Introdução

O gênero *Agaricus* L. ex Fr. inclui a espécie de cogumelo comestível mais importante economicamente, *Agaricus brunnescens* Peck. [= *A. bisporus* (Lange) Imbach] (MALLOCH, CASTLE & HINTZ, 1987), assim como outras espécies comestíveis tais como *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. e *Agaricus campestris* Fr. e uma espécie de importância medicinal, *Agaricus blazei* Murrill. Dentre os aspectos que caracterizam este gênero estão o estipe central, separado facilmente do píleo, lamelas livres de coloração clara no basidioma jovem, tornando-se marrom-escuras após o rompimento do véu, o qual está sempre presente e que freqüentemente forma, após o rompimento, um anel no estipe.

Cerca de 200 espécies de *Agaricus* foram identificadas, sendo separadas em sete seções denominadas Agaricus, Hortenses, Bitorques, Sanguinolenti, Xanthodermati, Arvenses e Minores. Estas seções diferenciam-se basicamente pelo tipo de anel presente e pelas reações de coloração do basidioma após fricção manual ou quando em contato com uma solução de hidróxido de potássio (KOH 5%). A separação das espécies em seções facilita a distinção entre espécies aparentemente semelhantes que, no entanto, pertencem a seções distintas. Além das características já citadas, outras que permitem a diferenciação entre as espécies são a dimensão dos esporos e das hifas, o arranjo das hifas na trama da lamela e no contexto e a estrutura hifal da cobertura do píleo (SINGER, 1975; ARORA, 1986; COURTECUISSÉ & DUHEM, 1994).

*Agaricus blazei* pertence à seção Arvenses, cujos basidiomas são robustos, apresentando uma reação lutescente, isto é, tornam-se amarelados ou alaranjados quando friccionados ou em contato com KOH, têm anel pendente e odor adocicado, semelhante ao de anis ou de amêndoas (SINGER, 1975; ARORA, 1986). Esta é uma de várias espécies campestres que podem ser confundidas devido à semelhança macroscópica dos basidiomas, mesmo pertencendo a seções diferentes. Dentre as espécies que se assemelham macroscopicamente a *A. blazei* estão *Agaricus xanthodermoides* Murrill (seção Xanthodermati), cujo basidioma é menos robusto e tem esporos maiores (FREEMAN, 1979), e *Agaricus silvaticus* Schaeffer (seção Sanguinolenti), que apresenta reação negativa quando em contato com KOH e reação rufescente, tornando-se avermelhado quando friccionado (MOSER, 1983; CAPELLI, 1984; COURTECUISSÉ & DUHEM, 1994).

Dentre as espécies comerciais, *A. blazei* diferencia-se de *A. brunnescens*, de *A. bitorquis* e de *A. campestris* por apresentar o píleo castanho, com pequenas escamas, ausentes naquelas espécies, e pela reação lutescente, enquanto as três espécies citadas não têm sua cor alterada quando friccionadas manualmente (ARORA, 1986; COURTECUISSÉ & DUHEM, 1994).

As espécies do gênero *Agaricus* são polimórficas, apresentando uma plasticidade marcante no desenvolvimento do basidioma, fato que contribui para o aparecimento de fenótipos variantes, resultado não só do genótipo, mas de interações do basidioma com o ambiente (ARORA, 1986). Em vista disso, e em consequência de existirem espécies semelhantes entre si, é fundamental a identificação taxonômica dos basidiomas oriundos de estirpes provenientes de empresas que comercializam cogumelos. Além dos problemas de identificação freqüentemente observados, o uso do nome coloquial na área comercial também é problemático. Embora a maioria das empresas utilize o nome “cogumelo do sol” para *A. blazei*, há algumas empresas que também usam este nome para a espécie *A. silvaticus*. Sendo assim, existe no país uma controvérsia envolvendo estas duas espécies, ambas comercializadas por apresentarem propriedades medicinais. Como análises taxonômicas dos basidiomas produzidos comercialmente não são uma prática freqüente nos cultivos, muitas vezes o produtor desconhece a espécie que está utilizando na produção.

O cultivo de espécies de *Agaricus* envolve a produção de um substrato, o composto, geralmente feito à base de resíduos lignocelulósicos e esterco animal, além de suplementos e corretivo de pH. Este substrato deve sofrer um processo de fermentação sólida, a compostagem, que implica na degradação microbiológica de seus constituintes, tornando-o mais seletivo para a espécie a ser cultivada. Em seguida o substrato deve ser pasteurizado para a eliminação de patógenos e contaminantes. O inoculante, que inclui o micélio do fungo desenvolvendo-se em um substrato normalmente constituído por grãos, é misturado ao composto na fase de inoculação. Após a inoculação ocorre um período de incubação denominado corrida micelial, que dura cerca de 30 dias, quando o fungo coloniza o composto. Ao final deste período de colonização uma camada de cobertura é adicionada sobre o composto miceliado com o objetivo de proporcionar as condições físicas, químicas e microbiológicas para a indução e formação dos basidiomas, propiciando a passagem da fase vegetativa para a reprodutiva, culminando na produção dos basidiomas (STAMETS, 1983; RINKER, 1993). No caso do “cogumelo do sol”, nome popular utilizado para duas espécies distintas, a produção de basidiomas é a única estratégia para que a identificação da espécie seja confirmada, particularmente quando as estirpes são disponibilizadas sob a forma de culturas.



A identificação das espécies é realizada através da análise das características dos basidiomas, sendo as mais importantes dentro do gênero *Agaricus* as alterações de cor devido a reações ao toque ou a reagentes como o KOH, o odor, a orientação das hifas na lamela, a estrutura da cobertura do píleo, a presença e a forma de cistídios no himênio, a dimensão e a forma dos esporos (SINGER, 1975; ARORA, 1984).

O isolamento e a manutenção de culturas de espécies comercializadas é uma prática corrente e muito importante, devendo ser realizada pelas empresas que mantêm bancos de germoplasma para a produção de inoculante, assim como para reprodução e pesquisas referentes às espécies (JODON, ROYSE & JONG, 1982; MATA *et al.*, 1994). Embora a identificação taxonômica seja impossível de se realizar através das características culturais, o estudo do micélio em cultura é uma fonte imprescindível de informações, tanto para complementar a taxonomia clássica quanto para o monitoramento destas culturas em pesquisas aplicadas e atividades rotineiras, como análise da variabilidade entre estirpes, detecção de contaminantes e de setorizações do micélio (STALPERS, 1978; RYVARDEN, 1991). O sistema de estudo de culturas proposto por NOBLES (1948, 1965), amplamente utilizado na caracterização de culturas fúngicas, consiste no estudo das culturas em meio ágar extrato de malte sob condições padronizadas, incubadas à temperatura de 25°C na ausência de luz, durante seis semanas, com observações macro e microscópicas semanais. Ao final do estudo, um código numérico sintetiza os resultados obtidos, onde cada dígito representa uma característica da cultura.

Desta forma, a fim de caracterizar os basidiomas provenientes das estirpes de “cogumelo do sol” como sendo *A. blazei*, foi realizado um estudo taxonômico dos basidiomas produzidos em cultivo experimental. Além disso, as características culturais das estirpes foram estudadas com o objetivo de complementar a taxonomia tradicional de *A. blazei* e detectar possíveis parâmetros relacionados à variabilidade intraespecífica.

## 2 Material e métodos

Para identificar os basidiomas produzidos a partir das seis estirpes, foi montado um experimento que possibilitou a produção dos basidiomas seguindo-se as técnicas de cultivo comercial utilizadas na região. Estas técnicas envolveram as seguintes etapas: produção de inoculante a partir das culturas, produção do substrato de cultivo (composto), preparo da camada de cobertura, instalação do experimento e manejo e, finalmente, coleta dos basidiomas.

## 2.1 Produção de inoculante a partir das culturas

As estirpes utilizadas foram obtidas junto à empresas de produção de cogumelos e receberam códigos numéricos para identificação, sendo eles: 21, 22, 23, 24, 33 e 34. As estirpes foram escolhidas aleatoriamente e sabia-se que a estirpe 22 era proveniente de um cultivo de baixa produtividade, enquanto para as demais a informação de sua produtividade era desconhecida. As culturas foram depositadas na coleção do Laboratório de Cogumelos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O inoculante foi produzido no Laboratório de Cogumelos da UFSC em frascos de 1000 mL contendo 650 g de grão de trigo previamente cozidos, aos quais foram adicionados 6 g de uma mistura de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{CaSO}_4$  (1:4). Foram preparados 19,5 Kg de inoculante de cada estirpe. Os frascos foram fechados com tampas contendo 2 a 3 perfurações (1 cm de diâmetro) vedadas com fita Micropore para permitir a transferência de gases. Em seguida o substrato foi esterilizado em autoclave durante duas horas a  $121^\circ\text{C}$  e foi levado à câmara de crescimento para que sua temperatura baixasse, atingindo a temperatura ambiente. Neste momento procedeu-se a inoculação do substrato em câmara de fluxo laminar. O inóculo consistiu de porções de micélio (1/4 de uma placa de 10 cm de diâmetro para cada frasco) provenientes das culturas de cada estirpe crescidas em ágar extrato de malte (AEM) com sete dias de incubação. Após o micélio colonizar completamente o substrato do frasco, o inoculante foi misturado ao composto.

## 2.2 Produção do substrato de cultivo

O composto utilizado neste experimento foi produzido na Fazenda Serra Azul, Pouso Redondo, SC, e teve como componentes básicos o bagaço de cana, palha vegetal e esterco de cavalo, além de suplementos e corretivos de pH e de textura. A sua formulação não será divulgada pelo fato de ser exclusividade do empresário e ligada à franquia. Os materiais foram misturados e então submetidos à um processo de fermentação denominado Fase I, realizado em galpão coberto, onde foi montada uma pilha de compostagem a qual foi submetida a diversas reviradas e irrigações de forma a uniformizar o substrato.

O composto foi transportado para uma câmara de pasteurização (Fase II) para a eliminação de insetos, ácaros, nematóides, bactérias e outros microorganismos que possam competir com o micélio de *Agaricus*. Neste processo o substrato foi submetido à temperaturas entre  $60^\circ\text{C}$  e  $65^\circ\text{C}$  por cerca de 12 horas, sendo condicionado por 8 dias em uma faixa de temperatura entre  $40^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$ , e resfriado em seguida até a temperatura ambiente. Ao final do processo, a amônia

volatilizou e a relação C/N foi de 16/1. Quando o composto atingiu a temperatura ambiente (cerca de 25°C) foi realizada a inoculação.

A inoculação do composto ocorreu na Fazenda Serra Azul, para onde foi transportado o inoculante produzido na UFSC. O composto foi embalado em sacos plásticos de 100 L, sendo que cada saco recebeu cerca de 15 Kg de composto. O inoculante foi homogeneizado ao composto durante o preenchimento dos sacos na proporção de 1%. Os sacos com substrato inoculado foram transferidos para um galpão fechado e dispostos em prateleiras para a colonização do composto pelo micélio (corrida micelial).

### **2.3 Preparo da camada de cobertura**

O solo utilizado na camada de cobertura foi selecionado pelos produtores locais de *A. blazei*, e apresentou textura franco-siltosa, tendo sido coletado no município de Antônio Carlos, SC. A este solo foi adicionada areia grossa de construção na proporção de 1:1 a fim de torná-lo mais poroso, com textura próxima à franco-arenosa. O solo e a areia foram misturados em betoneira e parte da mistura teve o pH corrigido para 7,0 com a adição de carbonato de cálcio. Foi realizada uma curva de pH com a mistura de solo e areia para se determinar a quantidade de carbonato de cálcio necessária para se obter pH 7,0. Outra parte foi mantida com o pH original, em torno de 4,7. Todo o solo foi desinfetado com formaldeído 37%, diluindo 1 L de formaldeído em 4 L de água, utilizando-se 4 L desta mistura para cada metro cúbico de cobertura. O solo foi coberto com uma lona plástica e após um período de 24 horas o formol evaporou e então o solo foi usado na cobertura. Também foram desinfetados com formaldeído pedriscos de 5 a 10 mm de dimensão que foram colocados sob a camada de cobertura. A camada de solo adicionada foi de cerca de 6 cm de espessura.

### **2.4 Instalação do experimento e manejo**

O experimento foi instalado em Ratoes Grande, Florianópolis, SC, na propriedade do Sr. Lourenço, produtor de “cogumelo do sol”, e conduzido em uma estufa plástica com prateleiras de madeira. O experimento foi realizado entre 15 de março e 1º de maio de 2000. A montagem do cultivo experimental foi realizada de acordo com a metodologia descrita por IWANE & MIZUNO (1997) em uma estufa plástica de 25 X 4 m e 2,5 m de altura, possuindo um ventilador na parte superior, um tubo plástico ao longo da estufa para forçar a circulação de ar e microaspersores laterais. O piso era de carvão e as paredes laterais tinham tela até a metade, as quais podiam ser fechadas com uma cortina plástica. O composto miceliado foi retirado dos sacos e disposto nas prateleiras de madeira formando lotes de 1,0 X 1,5 metros. A camada de cobertura foi colocada

da seguinte forma: caixas trapezoidais de madeira de 6 cm de altura, 1,5 m de comprimento com a base mais estreita de 6 cm e a abertura de 10 cm, foram preenchidas com a terra misturada com composto, os pedriscos foram colocados acima desta terra, de forma que quando a caixa fosse invertida sobre o composto, os pedriscos ficassem na parte inferior. Estes camalhões foram dispostos à distância de aproximadamente 6 cm uns dos outros e neste intervalo foi adicionada uma camada de 1 cm de terra não tratada com carbonato. Os lotes inoculados com estirpes diferentes foram dispostos à distância de cerca de 1,5 metros um do outro.

O controle da temperatura foi realizado pela entrada de ar externo através das aberturas laterais da estufa e os aspersores laterais, assim como o ventilador. As variações de temperatura e umidade dentro da estufa foram monitoradas através de um termohigrógrafo que foi colocado no interior da estufa e registrou a variação desses fatores ao longo dos dias.

Procurou-se controlar a temperatura durante a fase de crescimento vegetativo do micélio entre 28°C e 30°C, mantendo a umidade relativa do ar até um máximo de 75%. Durante esta fase a circulação de ar dentro da estufa foi feita sem a entrada de ar fresco, mantendo uma alta concentração de CO<sub>2</sub> no interior da estufa.

Após o micélio ter colonizado a camada de cobertura, tentou-se baixar as condições de temperatura durante a fase de indução dos primórdios para 25°C a 27°C, e a umidade relativa foi elevada até 85%, sendo que foram aumentadas as trocas de ar de forma a diminuir a concentração de CO<sub>2</sub>. Durante o cultivo a rega foi efetuada usando-se um nebulizador, duas vezes ao dia.

Com o início do aparecimento dos basidiomas procurou-se manter a temperatura entre 25°C e 27°C e a umidade em torno de 80%. As trocas de ar foram continuadas, para manter a concentração de CO<sub>2</sub> baixa.

## **2.5 Coleta dos basidiomas e isolamento**

Os basidiomas foram coletados manualmente no estágio imaturo e foram levados ao Laboratório de Cogumelos onde foram limpos, pesados e fotografados. O isolamento foi realizado sob condições de assepsia em câmara de fluxo laminar. Fragmentos da parte interna do píleo foram retirados, evitando-se retirar porções com esporos, e foram inoculados em meio ágar extrato de malte (AEM) em placas de Petri. As placas inoculadas foram incubadas em câmaras BOD a 28°C, sem iluminação. As culturas em crescimento foram acompanhadas visualmente e ao microscópio óptico para controle e eliminação de contaminantes. As culturas puras obtidas foram repicadas para novas placas com AEM e para tubos com meio ágar batata dextrose (ABD) inclinado, sendo um tubo de cada estirpe incorporado à coleção de culturas do Laboratório de

Cogumelos. Posteriormente, a secagem dos basidiomas foi realizada a 55°C por cerca de 24 horas.

## **2.6 Análise taxonômica**

Basidiomas produzidos em Ratores provenientes das seis estirpes foram transportados ainda frescos ao Laboratório de Micologia, Departamento de Botânica (BOT) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde procedeu-se a análise macro e microscópica para a identificação taxonômica. Alguns basidiomas foram deixados em câmara úmida à temperatura ambiente para a abertura do píleo, permitindo a obtenção da esporada (impressão dos esporos em papel) e para que todas as fases de desenvolvimento pudessem ser analisadas. As características macroscópicas observadas foram a dimensão do basidioma, a cor e alterações na cor (MUNSELL, 1975), a textura, o odor, o formato do píleo, as lamelas, a presença de véu ou de anel e a coloração da esporada. As características microscópicas observadas envolveram os tipos de hifas presentes, o arranjo das hifas nas lamelas, a estrutura da cutícula do píleo, a presença de cistídios, o formato dos esporos e as medidas das estruturas, assim como a alteração na cor das estruturas em contato com reagentes. Para a observação das características microscópicas, cortes de diferentes partes do basidioma foram feitos a mão livre sob microscópio estereoscópico. Estes cortes foram preparados entre lâmina e lamínula com o corante floxina 1% e o hidratante KOH 5% para a observação das estruturas, medidas e realização dos desenhos. Os cortes foram preparados também com o reagente de Melzer para a detecção de reações nas estruturas. Os desenhos foram feitos ao microscópio óptico, sob câmara clara, no aumento de 1000X. Depois de secos os basidiomas foram depositados no herbário FLOR (HOLMGREN, HOLMGREN & BARNETT, 1990) da Universidade Federal de Santa Catarina.

## **2.7 Estudo de culturas**

A caracterização das culturas foi realizada de acordo com a metodologia de NOBLES (1965), que consiste em analisar as características macro e micromorfológicas das culturas inoculadas em ágar extrato de malte (AEM: 15 g de extrato de malte (Merck), 15 g de ágar, 1000 mL de água destilada), incubadas sob a temperatura de 25°C. Um inóculo de 7 mm de diâmetro de cada estirpe foi transferido para placas de Petri (90 mm x 15 mm) com AEM, sendo posicionado junto à borda da placa. As culturas foram examinadas a intervalos de sete dias, durante seis semanas. Ao final deste período, utilizando-se a chave de identificação de culturas (NOBLES, 1965), foi obtido um código numérico, onde cada dígito representava uma característica da cultura.

Para determinar a produção de enzimas extracelulares, as culturas de cada estirpe foram inoculadas em placas de Petri com meio ágar ácido tânico e ágar ácido gálico (AAT e AAG) constituídos por 15 g de extrato de malte (Merck), 5 g de ácido tânico ou gálico, 20 g de ágar, 1000 mL de água destilada, e incubadas sob as condições definidas por NOBLES (1965), sendo observadas após uma semana. Quando o meio de cultura não tem sua cor alterada após uma semana de incubação, significa que o fungo é causador de podridão castanha e seu sistema enzimático é capaz de degradar a celulose, a hemicelulose e a lignina da madeira, se ocorrer alteração de cor, o fungo é causador de podridão branca, degradando apenas a celulose e a hemicelulose da madeira. A intensidade da reação foi avaliada de acordo com BETUCCI & GUERRERO (1971) e as cores foram descritas conforme o catálogo de MUNSELL (1975).

Para determinar a presença de enzimas extracelulares produzidas pelas culturas foram realizados testes bioquímicos que consistiram em pingar gotas de determinados compostos químicos identificadores de subprodutos de degradação do substrato na margem de culturas de 7 dias crescidas em AEM. A alteração de cor no meio de cultura ou no micélio indica a produção da enzima pela cultura. Os testes, descritos por KÄÄRIK (1965), HARKIN & OBST (1973), TAYLOR (1974) e STALPERS (1978), permitem detectar a produção de lacase, tirosinase e citocromo oxidase pelas culturas estudadas. Para a detecção de lacase, foram utilizados dois reagentes,  $\alpha$ -naftol e siringaldazina, a tirosinase foi detectada através da reação com  $p$ -cresol e a citocromo oxidase com tetrametil- $p$ -fenilenediamine dihidrogênio clorido (TM $p$ EDA).

### 3 Resultados e discussão

Os basidiomas provenientes das seis estirpes foram identificados como sendo *Agaricus blazei*, espécie descrita pela primeira vez por Murrill e publicada na *Quat. J. Florida Acad. Sci.*, 8: 193. 1945.

Os basidiomas foram depositados no herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina sob os números 11.794, 11.795, 11.796, 11.797, 11.798 e 11.799. Dados de coleta: Florianópolis, SC, 1/V/2000, coletor M. A. Neves, identificação M. A. Neves.

#### 3.1 Descrição dos basidiomas

BASIDIOMAS com 3 a 8 cm de altura (Figura 1); quando secos apresentaram coloração dourada fosca a alaranjada (5Y 8/4, 5Y 8/6); odor adocicado evidente, mas suave, de amêndoas doces. Houve uma variação entre as estirpes com relação à altura e massa médias, sendo que a estirpe 33 produziu basidiomas maiores e mais pesados que as demais estirpes (Tabela 1).

PÍLEO cilíndrico nos basidiomas jovens, 1,8-4,4 cm de diâmetro, subcilíndrico a sub-expandido nos espécimes maduros (abertos), 6,4-9,2 cm de diâmetro, marrom claro a médio (5Y 8/1, 5YR 3/3), lutescente, tornando-se amarelo (5Y 8/6) com KOH, desaparecendo a reação dentro de 1 a 2 minutos; escamas delicadas, mais próximas e fechadas nos espécimes jovens, quase da mesma cor (5YR 3/4) da superfície do píleo.

ESTIPE uniforme a sub-bulboso, oco, fibroso, 2,5-4,6 X 1,1-2,0 cm, 1 a 2 cm mais alargado na base; branco (5Y 8/1), lutescente, tornando-se amarelado (5Y 8/6) quando friccionado e amarelo muito forte (5Y 8/8) com KOH; após 1 a 2 minutos a reação com KOH tornou-se acinzentada; presença de cordões miceliais; superfície lisa; anel pendente, membranoso, branco com flocos marrons claros na superfície inferior.

LAMELAS livres serradas, brancas tornando-se marrom escuras com o amadurecimento dos esporos; esporada: 5YR 3/2, 2.5YR 2.5/4.

CONTEXTO branco (5Y 8/2), 5 a 9 mm, lutescente, tornando-se amarelado (5Y 8/6) quando friccionado ou cortado.

HIMÊNIO com basídios claviformes, 9,0-14,0 X 26,0-36,0  $\mu\text{m}$ , com quatro esporos, sem fíbulas na base (Figura 2a).

CISTÍDIOS mamiliformes raros, observados somente no himênio de espécimes jovens (Figura 2b).

ESPOROS ovóides a elipsóides, castanhos, lisos, de parede grossa, sem poro germinativo, 3,7-5,0 X 5,5-7,0  $\mu\text{m}$  (Figura 2c).

TRAMA das lamelas irregular, hifas retas de septo simples ou muito raramente com fíbulas, 3,0-5,0  $\mu\text{m}$ , algumas ampuliformes, até 12  $\mu\text{m}$  (Figura 2d).

COBERTURA do píleo não celular com hifas de septo simples, a maioria ampuliformes, castanhas, 11,0-17,5  $\mu\text{m}$ , algumas globulares, 25,5-44  $\mu\text{m}$ ; observaram-se fragmentos soltos, globulosos, de tamanho variável (Figura 2e).

CONTEXTO prosenquimatoso, com hifas retas, 5,0-7,0 (9,0)  $\mu\text{m}$ , raramente fibuladas (Figura 2f).

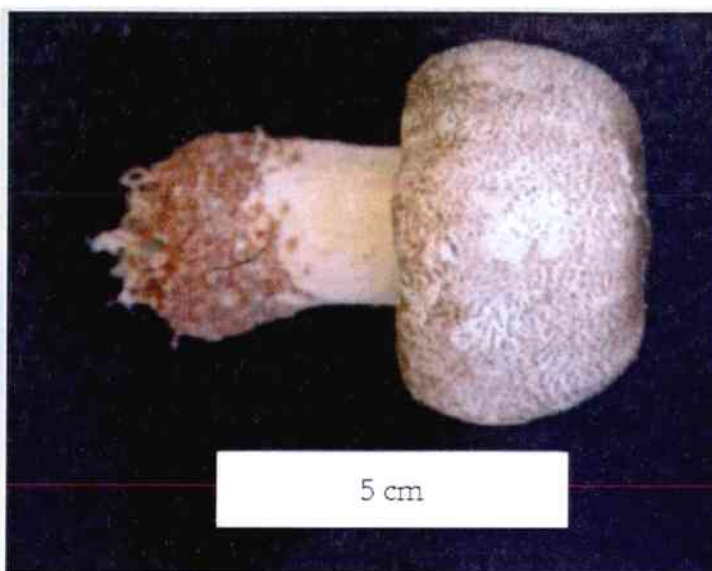


Figura 1: Basidioma de *Agaricus blazei* (#34) produzido em Ratoles em 26/04/2000.

Tabela 1: Massa seca média e altura média dos basidiomas obtidos a partir do cultivo de cada estirpe

Código das estirpes	Basidiomas (número)	Massa seca média <sup>1</sup> (g)	Altura média <sup>1</sup> (cm)
21	62	1,5	5,7
22	16	2,7	5,5
23	39	2,2	4,6
24	48	1,6	4,2
33	03	3,9	6,1
34	60	1,7	4,6

<sup>1</sup> Calculados com base no número de basidiomas produzidos por cada estirpe.



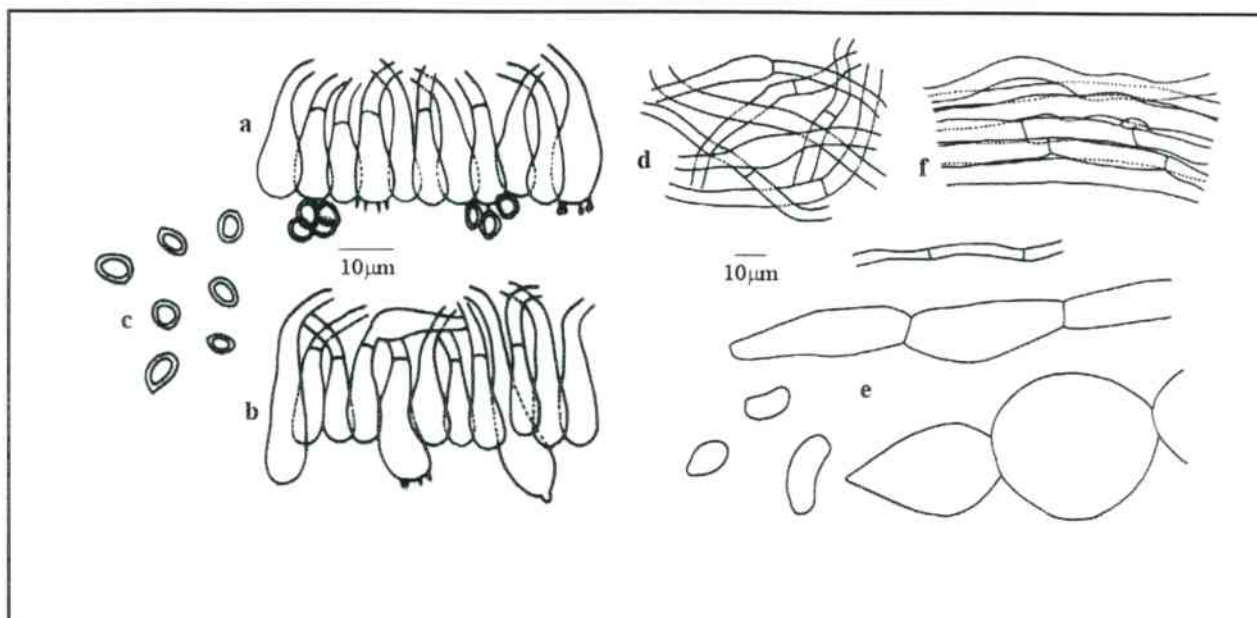


Figura 2: *Agaricus blazei*: a. himênio de basidioma maduro com basídios tetráspóricos; b. himênio de basidioma jovem com basidiolos e cystídio; c. esporos; d. trama da lamela; e. hifas e fragmentos da cobertura do píleo; f. contexto prosenquimatoso com hifas de septo simples e fibuladas.

A descrição original de MURRILL (1945) e a descrição feita por FREEMAN (1979) não mencionam a presença de cystídios e nem de fíbulas, características observadas nos espécimes analisados no presente trabalho. MURRILL (1945) cita a presença de células estéreis no himênio da margem das lamelas sem, no entanto, especificar a presença de cystídios. As hifas ampuliformes presentes nos espécimes analisados no presente trabalho foram observadas também por FREEMAN (1979) e por HEINEMAN (1993). A presença de cystídios foi descrita por HEINEMAN (1993), embora apresentando forma claviforme, diferente dos cystídios mamiliformes encontrados nos basidiomas jovens analisados no presente trabalho. A característica lutescente dos basidiomas foi observada também por HEINEMAN (1993).

As diferenças de tamanho, e conseqüentemente de peso, entre os basidiomas de cada estirpe, podem ser devidas à plasticidade encontrada nos basidiomas de espécies fúngicas, decorrentes, muitas vezes, do efeito de condições ambientais. Este efeito foi observado na alteração de forma e de coloração de basidiomas de *Pleurotus columbinus* Bres. e de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. em função da variação da intensidade luminosa e da temperatura (GUZMÁN *et al.*, 1994).

### 3.2 Caracterização das culturas

A caracterização macro e microscópica das culturas de *A. blazei* estudadas neste trabalho foi a seguinte:

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS (Figura 3) - As culturas apresentaram um micélio branco (5Y 8/2), inicialmente aderido ao meio de cultura, apresentando também crescimento submerso. Alguns feixes finos de hifas apresentaram crescimento mais rápido, crescendo bem aderidos ao ágar, em direção à borda. Após sete dias de crescimento o micélio formou tufo finos e algodonosos na metade do crescimento da colônia, os quais freqüentemente desenvolveram crescimento aéreo intenso, atingindo a tampa da placa. A partir da terceira semana o micélio tornou-se mais denso, podendo ou não apresentar-se amarelo claro (10YR 8/4). Esta coloração desenvolveu-se mais freqüentemente na região central da colônia. Houve uma alteração na cor do ágar para castanho claro (2,5YR 5/6 - 2,5 YR 4/6), sob o inóculo e ao seu redor. A margem da colônia em geral apresentou-se irregular, sem ser totalmente circular. Nas bordas das placas puderam ser observadas algumas hifas que se juntaram formando cordões miceliais. Após três ou quatro semanas de crescimento observou-se, em alguns casos, a produção de um exsudado sobre o micélio, constituído por gotículas marrons. O odor das culturas era adocicado forte, semelhante ao de amêndoas doces. As colônias não chegaram a atingir o diâmetro da placa de Petri ao final das seis semanas quando inoculadas junto à borda, sendo que a estirpe 22 foi a que apresentou o crescimento mais lento (Figura 4).

A reação para detecção das fenoloxidas extracelulares nos meios com ágar ácido tânico (AAT) e ágar ácido gálico (AAG) foi positiva: AAT, reação positiva (++), com crescimento de micélio; AAG, reação positiva (+), sem apresentar crescimento micelial.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS - O micélio apresentou hifas generativas (7,0-16,0 $\mu$ m) (21 $\mu$ m) pouco ramificadas, de septo simples (Figura 5a) ou raramente fibuladas (Figura 5b). No micélio submerso no ágar algumas destas hifas encontraram-se cobertas parcialmente por pequenos cristais (Figura 5c). Foram observadas também hifas ampuliformes (Figura 5d) (10,0-25,0 $\mu$ m), presentes em maior quantidade na região central da colônia estando ausentes no micélio aéreo da borda. A partir da segunda semana algumas hifas da região central da colônia apareceram pouco coradas.

A partir das características observadas no estudo de culturas, usou-se a chave de identificação proposta por NOBLES (1965) para se obter o código numérico das culturas, cujo resultado foi: 2, 5, 7, 16, 36, 39, 47, 50, 56. As seis estirpes analisadas produziram as enzimas lacase, tirosinase e citocromo oxidase.



Figura 3: Aspecto macroscópico da cultura de *Agaricus blazei* (#22) em AEM, ao final de sete dias de incubação a 25°C.

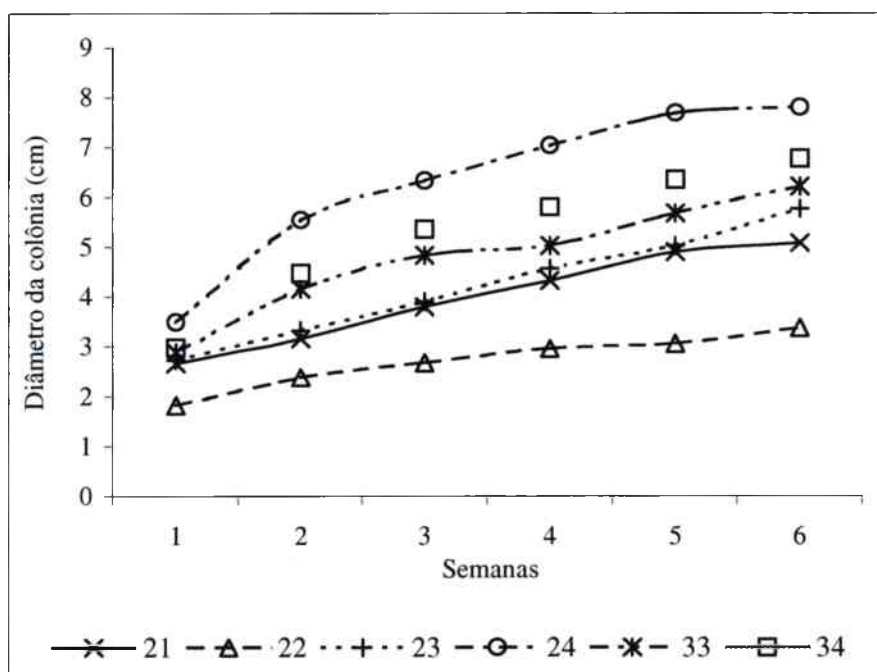


Figura 4: Crescimento médio das estirpes de *A. blazei* em meio AEM durante seis semanas. Os resultados são média de seis repetições.

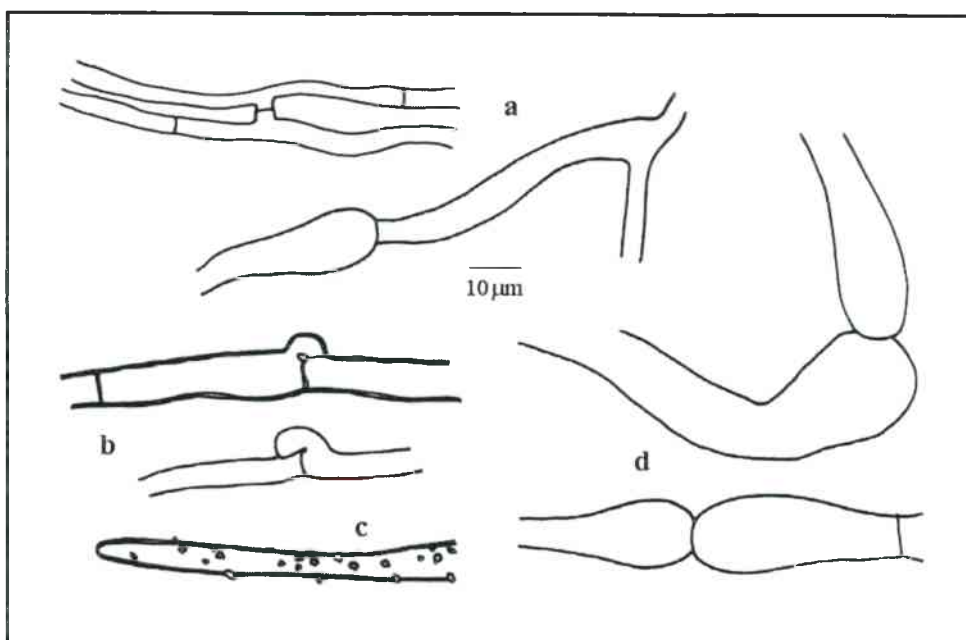


Figura 5: Características microscópicas culturais de *Agaricus blazei*: a. hifas generativas de septo simples; b. hifas generativas fibuladas; c. hifas com cristais; d. hifas ampuliformes.

#### 4 Conclusões

- ◆ As estirpes de “cogumelo do sol” produziram basidiomas em cultivo experimental que foram identificados como sendo *A. blazei*.
- ◆ Este trabalho apresenta a primeira caracterização de *A. blazei* em cultura, que permite ampliar as características da espécie, complementando a sua identificação, assim como fornece informações fundamentais para o monitoramento de culturas em diversas fases, principalmente por parte de empresas produtoras de inoculante.
- ◆ Os resultados apresentam, preliminarmente, evidências da existência de estirpes com características de crescimento diferenciadas.

## CAPÍTULO 3

**Efeito das condições ambientais no crescimento vegetativo de estirpes de *Agaricus blazei* Murrill provenientes de diferentes empresas****1 Introdução**

*Agaricus blazei* Murrill é um cogumelo nativo de regiões subtropicais usado como produto nutricêutico e com alto valor no mercado externo, fato que vem estimulando o seu cultivo no Brasil. A produção no país iniciou na década de 90 e vem sendo embasada nas técnicas de cultivo utilizadas para *Agaricus brunnescens* Peck., não existindo ainda tecnologias específicas para *A. blazei*. Por este motivo, a produtividade freqüentemente é baixa, o que leva muitos produtores à desistência. O aumento da produtividade depende do desenvolvimento de técnicas de produção do substrato de cultivo, da definição de um manejo apropriado durante o cultivo e da utilização de estirpes selecionadas, sendo que a integração dessas tecnologias é fundamental. Atualmente, são escassas as publicações disponíveis sobre a influência do substrato e das condições ambientais no crescimento de estirpes de *A. blazei* originárias do Brasil, não existindo informações também sobre a variabilidade intraespecífica (EGUCHI *et al.*, 1994; YONEYAMA, MEGURO & KAWACHI, 1997a; YONEYAMA, MEGURO & KAWACHI, 1997b; BRAGA & EIRA, 1999). Caso exista variabilidade entre as estirpes existentes no país, a otimização das técnicas de cultivo considerando as especificidades de cada estirpe será fundamental para o aumento da produtividade.

A caracterização ecológica das estirpes é de fundamental importância no aprimoramento das técnicas de cultivo, além de fornecer também informações sobre a variabilidade intraespecífica. Estirpes de *Agaricus subfloccosus* (J. E. Lange) Pilát. originárias da Inglaterra e do Canadá apresentaram maiores taxas de crescimento tanto *in vitro* quanto em composto quando comparadas com estirpes provenientes da Suíça estudadas sob as mesmas condições de laboratório (NOBLE *et al.*, 1995). Um estudo realizado com estirpes de *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) também permitiu a diferenciação de estirpes com diferentes taxas de crescimento em diferentes substratos (REYES *et al.*, 1998), enquanto trabalhos realizados com estirpes de *A. brunnescens* (HORNA & ROYSE, 1983) e de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (LEVANON *et al.*, 1993) possibilitaram a diferenciação das estirpes em função da temperatura ótima de crescimento. No caso de *L. edodes* é possível distinguir estirpes comerciais em função da temperatura ótima de frutificação (PRZYBYLOWICZ & DONOGHE, 1990). No caso de *A. blazei*, EGUCHI *et al.* (1994) avaliaram fatores ecológicos que afetaram o crescimento micelial de uma



estirpe *in vitro*. Nesse estudo foram definidas algumas características que propiciaram a otimização do crescimento da estirpe. Esses resultados são fundamentais em programas de seleção de estirpes mais adaptadas a condições de cultivo específicas e a determinadas épocas do ano.

Os resultados obtidos no capítulo 2 evidenciaram diferenças nas taxas de crescimento das seis estirpes de *A. blazei* estudadas, quando cultivadas no meio laboratorial ágar extrato de malte. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar diversos parâmetros ecológicos e seu efeito no crescimento vegetativo de seis estirpes de *A. blazei* provenientes de empresas diferentes, de tal forma que esses parâmetros possibilitem diferenciar as estirpes e também selecionar as melhores condições ambientais para o crescimento vegetativo de cada estirpe, tal como a composição do meio de cultura, a temperatura de incubação e o pH do meio.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Crescimento em diferentes meios de cultura e temperaturas**

A avaliação do crescimento vegetativo em dois meios de cultura laboratoriais sob diferentes temperaturas de incubação foi realizada no Laboratório de Micorrizas, Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O crescimento micelial foi avaliado através do diâmetro da colônia e da produção de biomassa.

O crescimento foi avaliado em meio ágar extrato de malte enriquecido com peptona de soja (AEMp), constituído por 30 g de extrato de malte (Merck), 3 g de peptona de soja, 15 g de ágar, 1000 mL de água destilada, e em meio ágar batata dextrose (ABD), constituído por 4 g de infuso de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar (Difco), 1000 mL de água destilada. Placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 25 mL dos meios sólidos AEMp e ABD, foram inoculadas no centro com uma porção de micélio de 7 mm de diâmetro, retirada da margem de uma cultura com três semanas de idade. Foram efetuadas quatro repetições para cada estirpe, sendo que as placas inoculadas foram incubadas em BOD sob quatro temperaturas: 20°C, 25°C, 28°C e 30°C. Para cada temperatura também foram efetuadas quatro repetições.

O crescimento foi medido com uma régua, pelo verso da placa, a cada dois dias, tomando-se dois diâmetros perpendiculares entre si. As médias dos diâmetros foram calculadas para cada tratamento e, então, para cada estirpe. Por questão de padronização, foram analisadas apenas as médias referentes ao crescimento ao final do período em que a primeira colônia de cada estirpe atingiu o diâmetro da placa, sendo este período de dez dias no meio AEMp e de doze dias no meio ABD. Porém a comparação e análises estatísticas foram efetuadas utilizando os resultados

correspondentes ao período de incubação de dez dias. Estes resultados foram submetidos à análise de variância múltipla utilizando-se o programa STATISTICA 5.0®.

A avaliação da produção de biomassa foi determinada usando-se as mesmas placas da avaliação do crescimento superficial após o micélio de uma das colônias ter coberto toda a superfície do meio de cultura na placa. Para isto, foram utilizados béqueres de 500 mL onde foram adicionados 250 mL de água destilada e o meio de cultura com o micélio crescido. O meio de cultura foi, então, dissolvido durante 4 minutos em forno de microondas. O micélio foi recolhido em uma peneira fina e colocado para secar em estufa, em cadinhos de papel alumínio pré-pesados, durante 24 horas a 105°C, ou até atingir massa constante. Em seguida, foi calculada a média da biomassa atingida por cada estirpe e estes resultados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 5.0®.

## **2.2 Crescimento em diferentes pH**

O efeito do pH no crescimento foi avaliado utilizando-se meio mínimo suplementado com glicose (MMG), constituído por 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{CaCl}_2$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g glicose, 15 g ágar, 1000mL água destilada, conforme estabelecido por WENZEL & DIAS (1999), com os valores de pH 6,0, pH 7,0 e pH 8,0, utilizando tampão fosfato. Placas de Petri preenchidas com meio mínimo foram inoculadas no centro com uma porção de micélio de 7 mm de diâmetro, retirada da margem de uma cultura com três semanas de idade e foram incubadas a 28 °C. O pH foi ajustado antes da esterilização e foi medido também após o crescimento do micélio fúngico.

O crescimento e a produção de biomassa de cada estirpe foram avaliados do mesmo modo descrito no item 2.1. Foram realizadas quatro repetições para cada estirpe para cada valor de pH e as médias foram calculadas para cada tratamento. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 5.0®.

## **2.3 Crescimento em composto comercial**

A capacidade de cada estirpe de crescer em composto comercial foi analisada através da avaliação da taxa de crescimento do micélio e da produção de biomassa no composto inoculado *in vitro*, sem esterilização, e incubado sob condições controladas de temperatura. Esta medida visou avaliar o crescimento das estirpes em condições de substrato semelhantes àquelas de um cultivo comercial.

Foram utilizados tubos de vidro de 185 mm de comprimento e 25 mm de diâmetro com as duas extremidades abertas, os quais foram preenchidos com cerca de 30 g de composto comercial

produzido na Fazenda Serra Azul, Pouso Redondo, SC. As extremidades dos tubos foram fechadas com tampões de algodão e a inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar, a partir de culturas puras crescidas em meio AEM suplementado com composto não miceliado (40 g por litro de meio). A inoculação foi realizada usando-se uma das extremidades do tubo, que foi utilizada para cortar uma porção circular de inóculo na cultura, o qual ficou com o diâmetro exato do tubo. Com o auxílio de uma alça, o inóculo foi introduzido no tubo até entrar em contato com o composto. Após a inoculação os tubos foram incubados em BOD a 28°C. O crescimento micelial foi avaliado medindo-se a distância desde a extremidade inoculada do composto até a margem do micélio em crescimento. A primeira avaliação foi realizada no terceiro dia e, a partir daí, as avaliações foram efetuadas a cada dois dias (DUNCAN, 1997). Foram preparadas 5 repetições para cada estirpe e um tratamento controle (não inoculado). Os resultados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 5.0<sup>®</sup>.

A biomassa produzida no composto foi estimada pela análise da quantidade de ergosterol extraída das amostras. Cada amostra incluiu 1 (um) grama de composto de cada repetição, a partir da qual foi realizada a extração de ergosterol por 3 minutos com 5 mL de etanol gelado e 10% de polivinil-pirrolidona (PVPP). O PVPP permitiu a precipitação dos compostos fenólicos que poderiam interferir na determinação espectrofotométrica do ergosterol. A mistura extraída foi transferida para tubos e centrifugada a 2.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspendido em 5 mL de etanol, agitado em vortex por 30 segundos e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após a última centrifugação os dois sobrenadantes foram misturados, ajustando-se o volume para 5 mL, sendo então filtrados com uma seringa através de membrana Millipore de 0,50 µm de poro. Os componentes foram separados por HPLC (MARTIN, DELARUELLE & HILBERT, 1990).

### **3 Resultados e discussão**

#### **3.1 Efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento**

Foi observada uma diferença no tempo que as estirpes levaram para cobrir as placas de Petri com os diferentes meios de cultura. No meio AEM cinco estirpes, 21, 23, 24, 33 e 34, cobriram a superfície da placa de Petri ao final de 10 dias de incubação. Já no meio ABD, o período para estas mesmas estirpes atingirem o diâmetro da placa foi de 12 dias. A estirpe 22 se diferenciou das demais apresentando crescimento mais lento, ocupando a superfície total da placa no meio AEM ao final de 20 dias, enquanto no meio ABD este período foi de 14 dias.



Considerando-se os dois meios de cultura utilizados, pode ser observado na Figura 1 que, tanto em AEM quanto em ABD, a estirpe 22 apresentou um crescimento mais lento do que as demais estirpes. Esta observação foi confirmada através do Teste de Scheffè (Anexo 1). Além disso, a estirpe 33 teve o crescimento mais rápido em AEM, enquanto a estirpe 24 teve o crescimento mais rápido em ABD, segundo o Teste de Scheffè.

Analisando-se a Figura 2, observamos que não foi possível detectar diferenças significativas na quantidade de biomassa produzida pelas seis estirpes no meio AEM. No meio ABD a estirpe 22 foi a que produziu a menor quantidade de biomassa em relação às demais estirpes (Anexo 2). A produção de biomassa não apresentou relação direta com o diâmetro da colônia e não foram detectadas diferenças entre as estirpes quanto à produção de biomassa dentro de uma mesma temperatura (Anexo 3).

Analisando o comportamento das estirpes nas temperaturas de 20°C, 25°C, 28°C e 30°C, foi observado que o crescimento foi mais lento quando as estirpes foram incubadas a 20°C. A estirpe 22 apresentou crescimento mais lento que as demais estirpes nas temperaturas de 25°C, 28°C e 30°C (Figura 1), sendo essa diferença confirmada pelo Teste de Scheffè (Anexo 4). Quando as estirpes foram incubadas a 20°C não houve diferença no diâmetro da colônia.

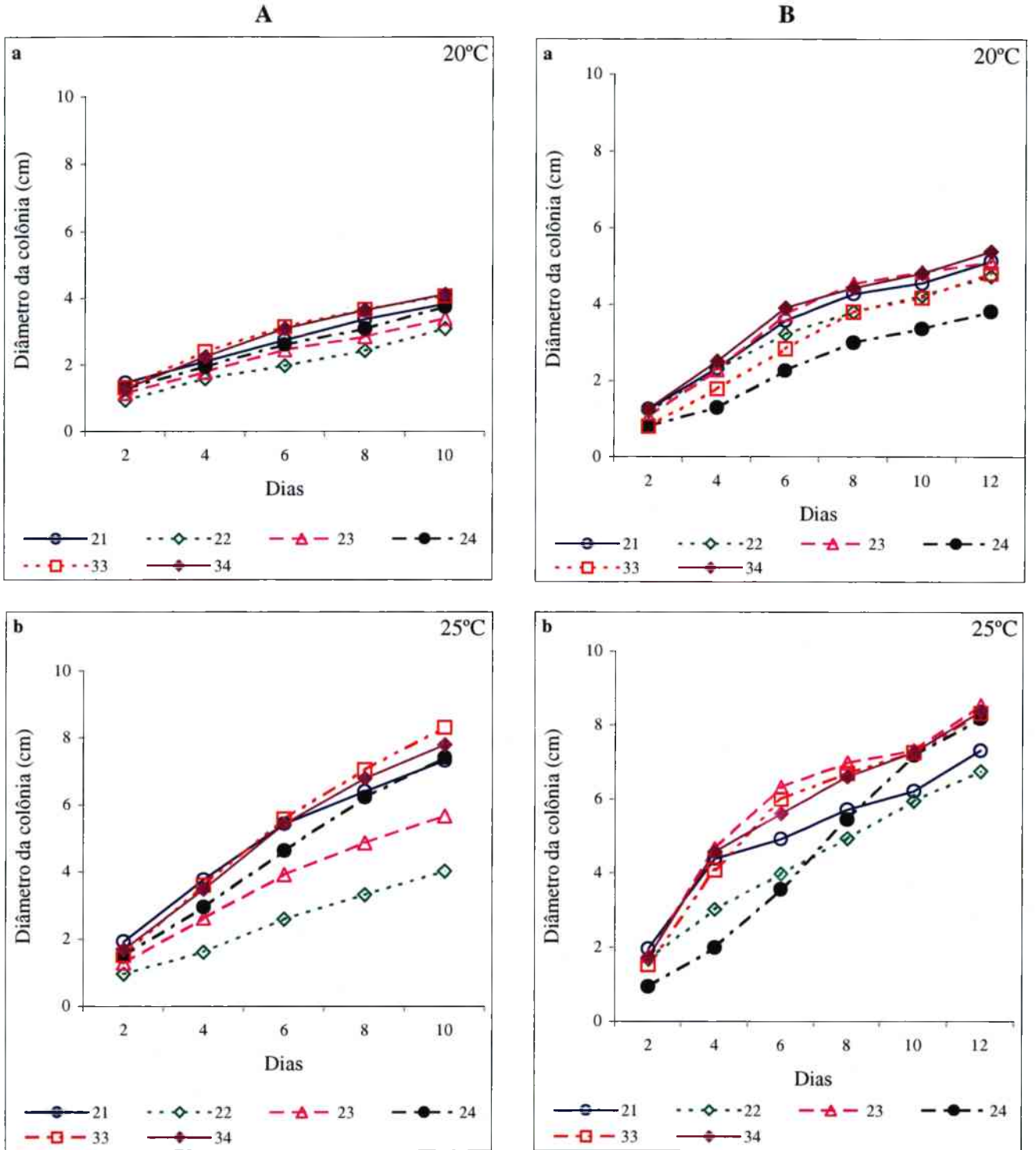


Figura 1: Crescimento das seis estirpes de *A. blazei* ao longo do tempo em meio AEM (A) e em meio ABD (B), incubadas a 20°C (a), 25°C (b), 28°C (c) e 30°C (d).

(Cont.)

(Cont.)

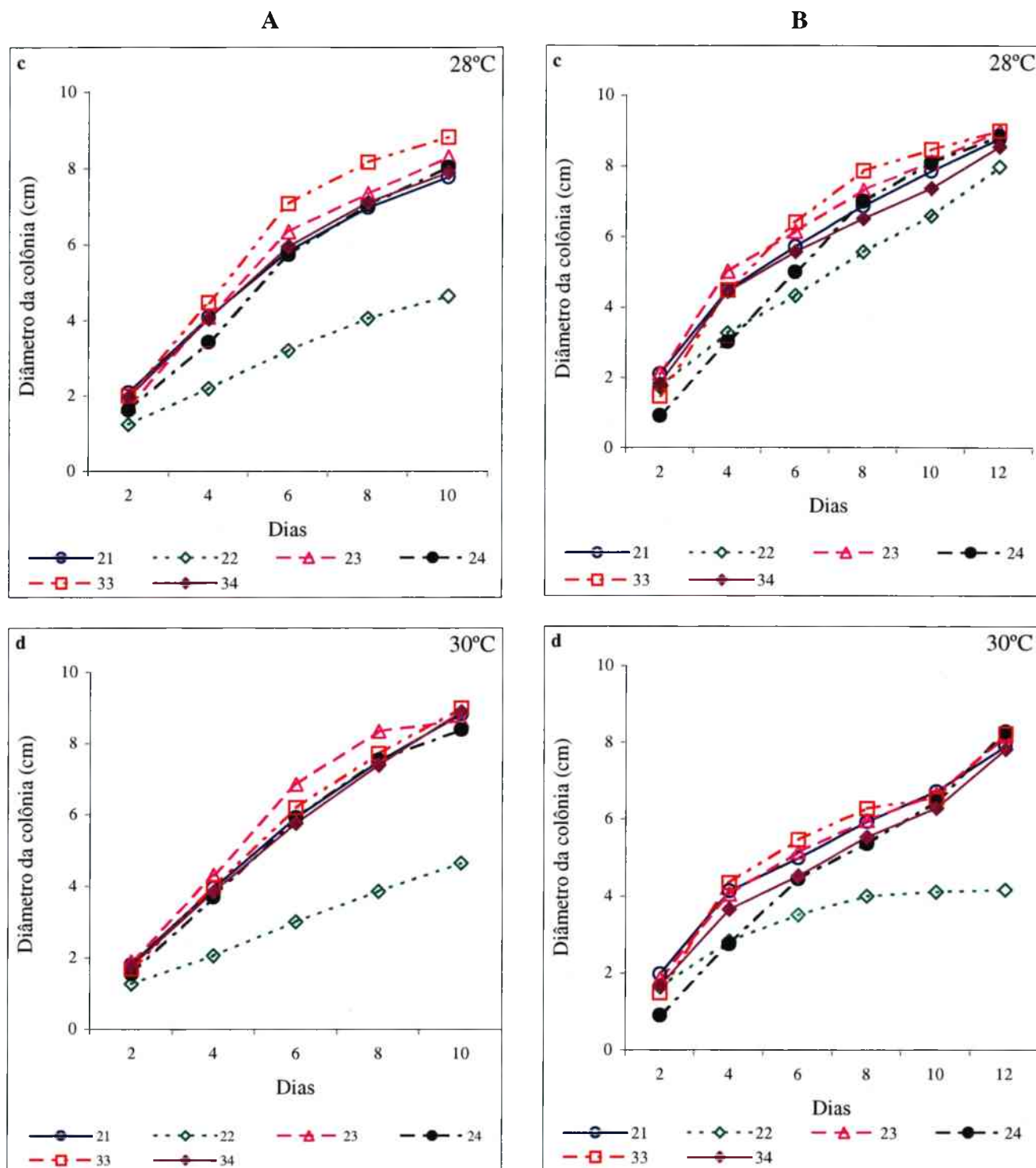


Figura 1: Diâmetro das colônias das seis estirpes de *A. blazei*, ao longo do tempo, em meio AEM (A) e em meio ABD (B), incubadas a 20°C (a), 25°C (b), 28°C (c) e 30°C (d).

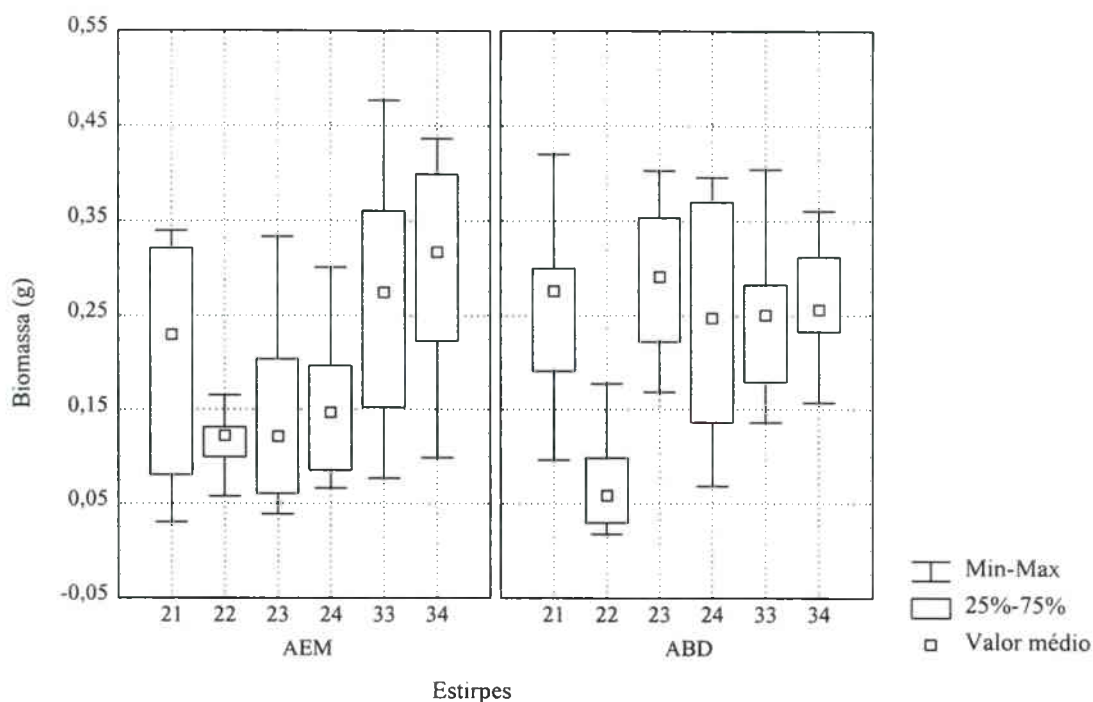


Figura 2: Biomassa produzida pelas seis estirpes em meio AEM e em meio ABD após dez dias de incubação.

Segundo os resultados obtidos, a temperatura de 20°C foi a menos favorável ao crescimento para todas as estirpes. Esta foi considerada a temperatura mínima para o crescimento de *A. blazei* por EGUCHI *et al.* (1994). Estes autores mediram o crescimento de *A. blazei* em um meio sólido constituído de extrato de malte, extrato de levedura e sacarose, e incubaram as culturas em sete temperaturas diferentes, variando entre 15°C e 45°C, com intervalos de 5°C. A temperatura máxima de crescimento obtida foi de 35°C e a faixa ótima de temperatura ficou entre 22°C e 26°C, condição em que foi observado um micélio mais denso. Os autores não fizeram nenhuma medida de biomassa e analisaram a densidade do micélio apenas visualmente. O maior crescimento do micélio a partir de 25°C, encontrado no presente trabalho, e a faixa citada por EGUCHI *et al.* (1994), estão de acordo com a temperatura média diária das regiões onde esta espécie naturalmente ocorre, em zonas subtropicais, entre 20°C e 30°C (FREEMAN, 1979; HEINEMAN, 1993).

A biomassa produzida pelas estirpes, não apresentou relação direta com o diâmetro da colônia. LONERGAN, JONES & MAINWARING (1994) comparando estirpes de *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall também não observaram relação entre estes parâmetros de crescimento fúngico. Estas diferenças resultam do fato de que medindo-se o diâmetro da colônia tem-se apenas a área de crescimento superficial do micélio no meio de cultura, enquanto a medida da

produção de biomassa envolve o desenvolvimento de micélio aéreo e submerso, assim como a ramificação das hifas (LONERGAN *et al.*, 1994). A complexidade e a composição do meio de cultura estão relacionadas com estas taxas de crescimento e com a produção de biomassa. O crescimento das hifas ocorre nas extremidades, as quais produzem as enzimas necessárias para a degradação e absorção dos nutrientes do meio, utilizando a energia dos nutrientes armazenados e que são translocados a partir das porções hifais mais antigas para o ápice. A extensão hifal permite a exploração de regiões ainda não colonizadas do substrato na busca por nutrientes, já as ramificações permitem a utilização completa do meio já colonizado através do crescimento do micélio no interior do substrato (PROSSER & TOUGH, 1991; LONERGAN *et al.*, 1994; GRIFFIN, 1994).

Sendo assim, o efeito das fontes de carbono disponíveis no meio sobre o crescimento micelial pode estar relacionado à complexidade ou à dimensão das moléculas que constituem o meio. A absorção de moléculas maiores depende de um processo que envolve diferentes enzimas até que seja obtida uma molécula simples e solúvel que possa ser absorvida pela hifa (MOORE-LANDECKER, 1992). No trabalho de EGUCHI *et al.* (1994) os meios com sacarose e glicose foram os que propiciaram maior crescimento para a estirpe de *A. blazei* estudada. Estirpes de *Volvariella volvacea* (Bull ex. Fr) Singer também cresceram mais rapidamente em meio de cultura contendo sacarose do que em meio contendo polissacarídeos mais complexos (REYES *et al.*, 1998). No entanto, os autores afirmaram que o micélio desenvolvido no meio contendo polissacarídeos se apresentou mais denso do que aquele produzido no meio contendo sacarose. Os autores avaliaram a densidade do micélio apenas visualmente e não realizaram nenhuma medida de biomassa.

### 3.2 Efeito do pH no crescimento

O comportamento das seis estirpes nos três níveis de pH testados foi parecido, sendo que nenhuma delas apresentou crescimento em pH 8,0 (Figura 3). O Teste de Scheffê mostrou que em pH 6,0 a estirpe 22 apresentou o menor crescimento (Anexo 4), assim como esta mesma estirpe, juntamente com a estirpe 23, teve o menor crescimento em pH 7,0 (Anexo 5).

Neste caso também não houve relação direta entre o diâmetro da colônia e a biomassa produzida. A estirpe 22, que teve o menor diâmetro em pH 6,0, também produziu a menor quantidade de biomassa. No entanto as estirpes 33 e 34 produziram quantidade de biomassa equivalente à produzida pela estirpe 22, mesmo tendo apresentado uma colônia maior (Figura 4). Em pH 7,0 as estirpes não apresentaram diferenças na quantidade de biomassa produzida (Anexo 6).

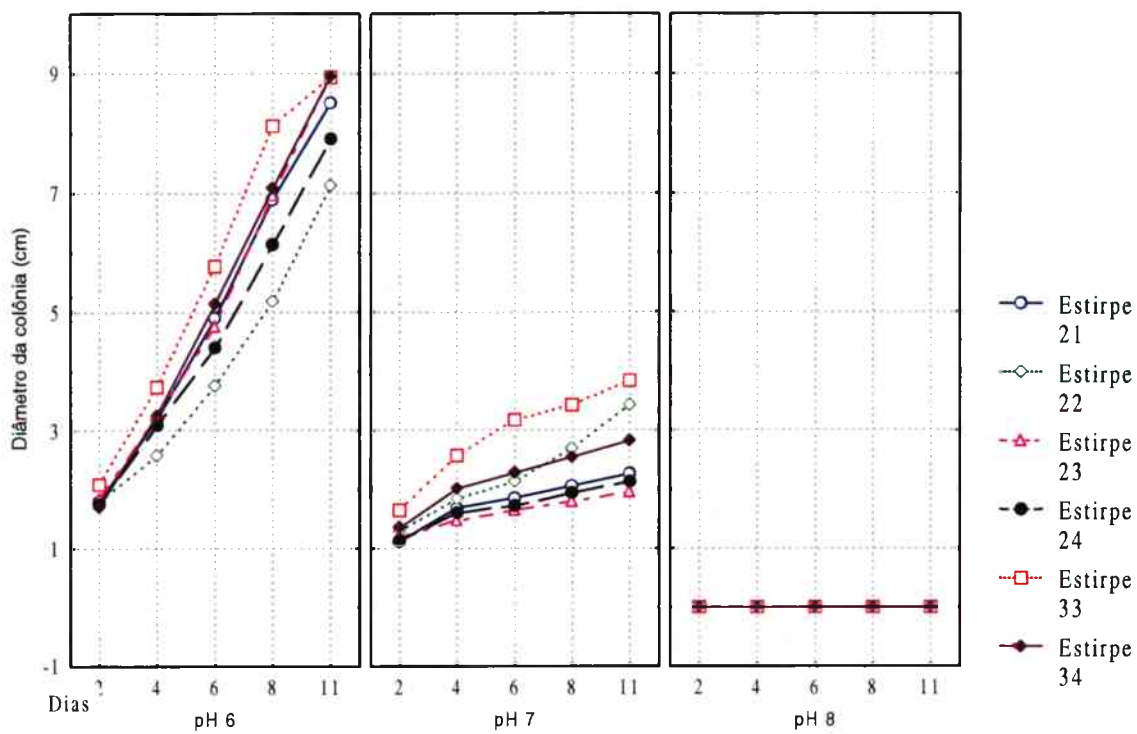


Figura 3: Efeito do nível de pH no diâmetro das colônias de *A. blazei*.

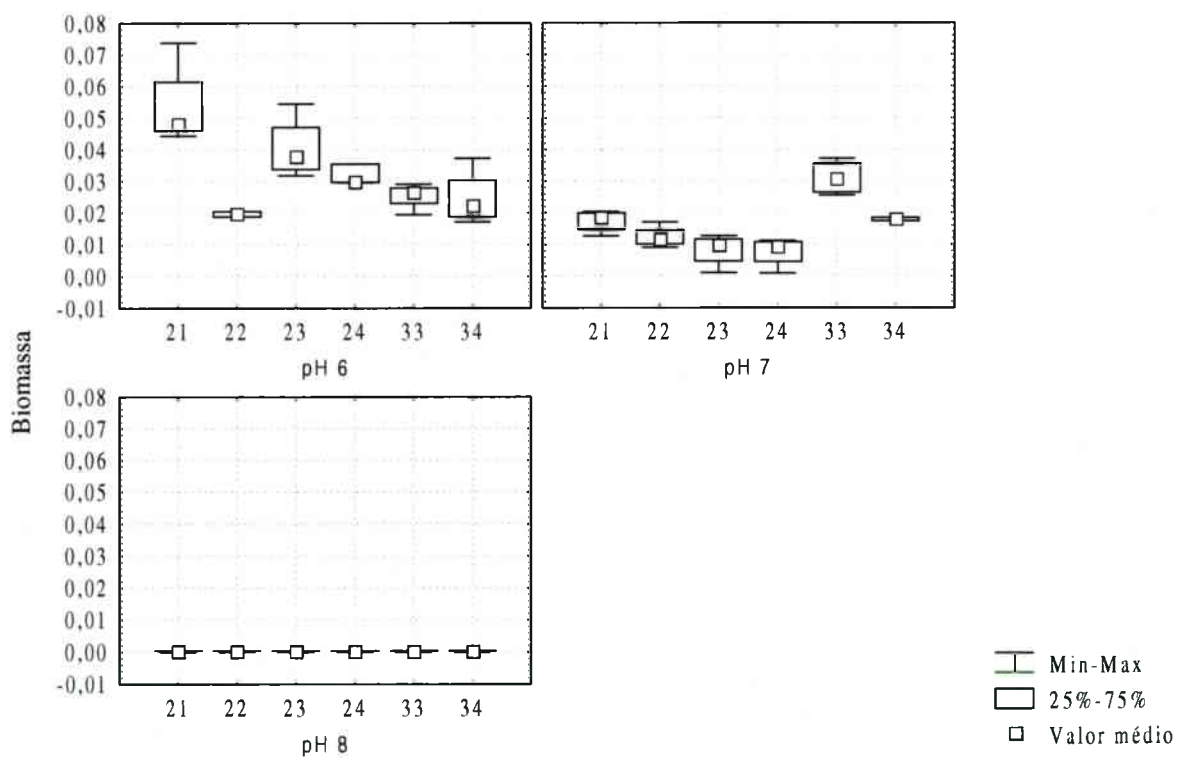


Figura 4: Biomassa produzida pelas seis estirpes nos níveis de pH 6,0, 7,0 e 8,0.



O tampão fosfato mostrou ser um bom tamponante para o meio básico utilizado, já que, após o crescimento, houve uma variação insignificante do pH original. O meio com pH 6,0 passou para pH 5,8 após o crescimento do fungo, o com pH 7,0 passou para pH 6,8, enquanto o meio com pH 8,0 passou para pH 7,7.

Dentro da faixa de pH selecionada para *A. blazei* por EGUCHI *et al.* (1994), de 4,0 a 9,0, o pH 6,0 foi o que propiciou o melhor crescimento micelial em meio de cultura sólido contendo sacarose, extrato de malte e extrato de levedura, coincidindo com o pH ótimo observado no presente trabalho. Na faixa de pH a partir de 8,5, EGUCHI *et al.* (1994) observaram uma redução no crescimento micelial. No presente trabalho, no entanto, não foi sequer observado crescimento micelial em pH 8,0. Os fungos normalmente alteram o pH do meio de cultura durante seu crescimento, sendo portanto importante o uso de um tampão quando se avalia o efeito do pH. No entanto, existe a possibilidade de a concentração do tampão ser inibitória para o crescimento do fungo (GRIFFIN, 1994), fator que pode ter influenciado os resultados do meio com pH 8,0. Além disso, o pH extracelular pode ter efeitos significativos em componentes ativos da parede celular e da superfície da membrana afetando, assim, a permeabilidade de estruturas de crescimento, resultando também na inibição do crescimento hifal (GRIFFIN, 1994; REYES *et al.*, 1998).

O cultivo de *A. blazei* em composto com pH alcalino, assim como o uso de uma camada de cobertura com pH ajustado para 7,0, poderão não propiciar as condições ideais para o crescimento micelial da espécie (IWADE & MIZUNO, 1997; BRAGA *et al.*, 1998). Os resultados encontrados por EGUCHI *et al.* (1994) baseados em experimentos realizados com uma estirpe e confirmados no presente trabalho, onde seis estirpes comerciais foram estudadas, sugerem que cultivos experimentais deverão ser realizados com os níveis de pH dos substratos corrigidos em torno de 6,0, de forma a definir o nível que viabiliza o maior crescimento vegetativo de *A. blazei* em composto.

### **3.2 Avaliação do crescimento em composto comercial**

Cinco estirpes, 21, 23, 24, 33 e 34, colonizaram completamente o composto ao final do 13º dia de incubação. A estirpe 22 apresentou um crescimento mínimo ao final deste período (Figura 5). O Teste de Scheffè (Anexo 7) confirmou o crescimento mais lento da estirpe 22, sendo que a estirpe 33 foi a que teve o segundo crescimento mais lento e a estirpe 34 apresentou o crescimento mais rápido.

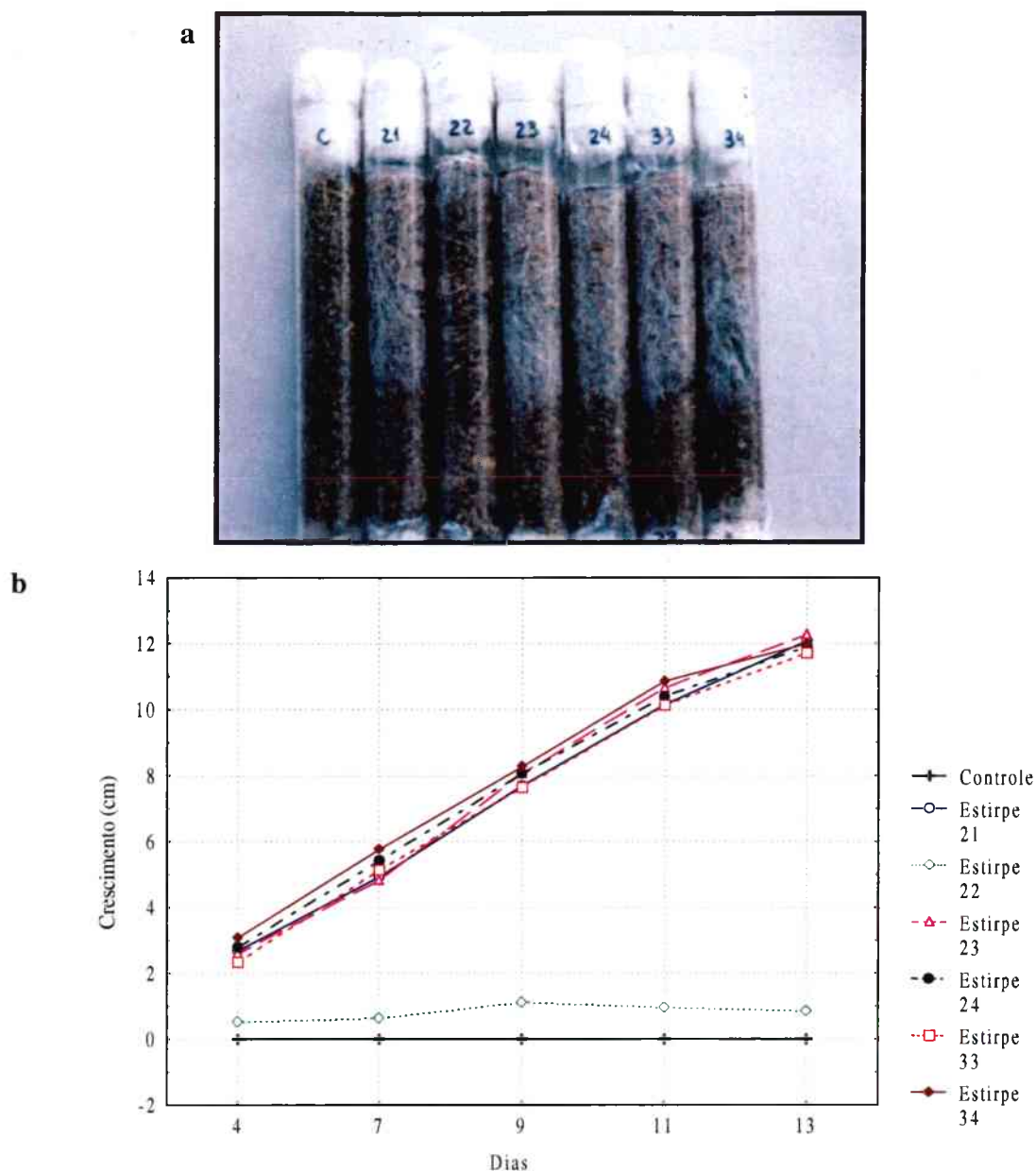


Figura 5: Crescimento do micélio das seis estirpes de *A. blazei* em composto comercial, nove dias após a inoculação (a) e crescimento linear ao longo do tempo (b).

Em um dos tubos inoculados com a estirpe 22 foi observado o crescimento de um micélio branco contaminante, mais fino e tênue do que o de *A. blazei*, na metade do tubo, próximo à extremidade que não foi inoculada, fato que demonstra a suscetibilidade deste fungo à competição e confirma a existência de outros microorganismos no substrato. Este fato é esperado, visto que o composto foi submetido apenas à pasteurização durante a Fase II de sua produção, tratamento que não elimina totalmente a microbiota presente no substrato.

Os substratos não inoculados apresentaram quantidades elevadas de ergosterol (602,43  $\mu\text{g/g}$  de peso seco), sendo que observou-se uma diminuição significativa na quantidade de ergosterol quando os tubos foram completamente colonizados pelo micélio do *A. blazei* (entre



163,62 e 187,80  $\mu\text{g/g}$  de massa seca). A quantidade de ergosterol detectada nos tubos inoculados com a estirpe 22, que teve crescimento reduzido no composto, foi de 514,04  $\mu\text{g/g}$  de massa seca, valor aproximado daquele encontrado nos tubos não inoculados (Figura 6). O Teste de Scheffê (Anexo 8) diferenciou a estirpe 22 e o controle das demais estirpes. Estes resultados apresentaram um relação inversa com a colonização do substrato.

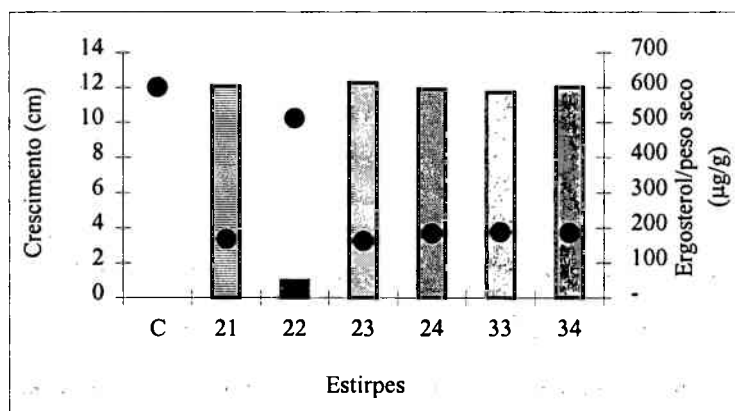


Figura 6: Relação entre o crescimento linear do micélio de *A. blazei* ao final de treze dias (barras) e a quantidade de ergosterol detectada (pontos).

A quantidade de ergosterol detectada no composto completamente colonizado pelo micélio de *A. blazei*, entre 163 e 187  $\mu\text{g/g}$  de massa seca, correspondeu à quantidade de ergosterol encontrada no micélio de *A. brunnescens* por MACAULEY & BETHEL (1990). Por outro lado, várias espécies de fungos são normalmente encontradas no composto, tais como *Humicola* spp., *Chaetomium* spp., *Talaromyces* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp., todos fungos mitospóricos (“Deuteromycetes”), cujo conteúdo de ergosterol detectado é superior àquele encontrado para Basidiomycetes. Os conteúdos de ergosterol registrados no micélio dos fungos mitospóricos variam de 230 a 1.190  $\mu\text{g/g}$  de massa seca (NEWELL, 1992; NEWELL, 1994; BJURMAN, 1994; PASANEN *et al.*, 1999).

A biomassa quantificada através da medida do ergosterol refere-se à biomassa viável presente no substrato, uma vez que este componente faz parte da membrana e do citoplasma, tanto do micélio quanto dos esporos, e normalmente é degradado após a morte do organismo (NEWELL, 1992). Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho em relação às estirpes 21, 23, 24, 33 e 34, sugerem um efeito antagonístico entre o micélio de *A. blazei* e o de outros fungos presentes no composto. CAMP *et al.* (1990) observaram uma relação semelhante entre *A. brunnescens* e *Scytalidium thermophilum* (Cooney & Emerson) Austwick e verificaram que *A. brunnescens* causou desintegração irreversível do protoplasma de *S. thermophilum*, substituindo

o micélio deste fungo em meio de cultura. De forma semelhante, WIEGANT *et al.* (1992) investigaram a promoção do crescimento do micélio de *A. brunnescens* pelo fungo *S. thermophilum*, e observaram um aumento considerável na taxa de crescimento de *A. brunnescens* na presença de *S. thermophilum* em cultura. O efeito antagonístico do crescimento do micélio já foi registrado também em estirpes de *L. edodes* em relação à *Trichoderma* em estudos *in vitro* (MATA & SAVOIE, 1998). Estes resultados demonstraram a existência de diversos tipos de interações microbianas no composto pasteurizado, o qual constitui o substrato para a produção de cogumelos.

O objetivo da compostagem é aumentar a seletividade para o crescimento do micélio de *Agaricus*. Durante o processo, ocorre uma sucessão microbiana e também uma acumulação de material biológico e metabólitos, os quais não podem ser desconsiderados como fonte de nutrientes para o micélio de *Agaricus* (DERIKX *et al.*, 1990). A competição entre fungos em diversos ambientes é um fenômeno conhecido e o micélio pode ser usado como fonte de nutrientes por fungos que são dominantes ou que estão melhor adaptados em um determinado substrato (DIX & WEBSTER, 1995).

MACAULEY & BETHEL (1990) sugeriram o uso da medida de ergosterol como indicador de biomassa de *A. brunnescens* no composto durante o crescimento do micélio em condições controladas. No entanto, o composto utilizado em cultivo de cogumelos não é estéril, e uma grande quantidade de contaminantes, fungos e esporos resistentes, permanece no composto após a pasteurização, interferindo no resultado da extração do ergosterol. Este método pode ser mais útil na avaliação da eficiência do crescimento de estirpes de *Agaricus* em compostos comerciais utilizados no seu cultivo, através da comparação da medida inicial total de ergosterol e da medida de ergosterol posterior à colonização pelo micélio de *Agaricus*. Estudos *in vitro* podem complementar estas análises de eficiência através do confronto entre o micélio de *Agaricus* e de fungos isolados do composto.

A estirpe 22 apresentou crescimento menor do que as demais estirpes em composto, não se desenvolvendo eficientemente. Este resultado é importante para o cultivo, pois essa estirpe, além de apresentar um crescimento menor em condições *in vitro* (na ausência de competidores), também não apresentou capacidade para competir com os microorganismos presentes originalmente no composto.

## 4 Conclusões

- ◆ Os resultados obtidos confirmam a existência de estirpes diferentes, sendo que a estirpe 22 se diferencia das restantes, indicando a existência de variabilidade ecológica intraespecífica para *A. blazei*.
- ◆ As principais características que distinguiram a estirpe 22 das demais foram a menor taxa de crescimento vegetativo e a menor produção de biomassa nos meios e temperaturas de incubação, assim como a baixa competitividade desta estirpe em relação a outros microorganismos presentes em composto comercial.
- ◆ Programas de seleção *in vitro* devem ser realizados com a estirpe e o composto comercial a ser utilizado previamente à instalação do cultivo.

## CAPÍTULO 4

# Características fisiológicas e genéticas de estirpes de *Agaricus blazei* Murrill provenientes de diferentes empresas

### 1 Introdução

*Agaricus blazei* Murrill é um cogumelo que ocorre naturalmente em pradarias em regiões subtropicais, sendo que seu cultivo comercial é realizado em substratos basicamente lignocelulósicos, aos quais se adicionam suplementos e corretivos. Os componentes lignocelulósicos mais frequentemente utilizados no cultivo desta espécie são o bagaço de cana e palhas vegetais, os quais são combinados em diversas formulações. Já os suplementos podem envolver esterco animal ou outras fontes de nitrogênio orgânicas ou inorgânicas. Finalmente os corretivos visam tamponar o pH do substrato e melhorar a sua estrutura, sendo o gesso e o calcário os constituintes mais usados para este fim (BRAGA *et al.*, 1998).

Os principais componentes dos substratos lignocelulósicos utilizados no cultivo destes fungos são a celulose, hemicelulose, lignina e fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (BONNEN, ANTON & ORTH, 1994; STRAATSMA *et al.*, 1994). A utilização desses componentes pelos fungos depende da capacidade das espécies em sintetizar enzimas oxidativas, tais como lacase, peroxidase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, e hidrolíticas, como celulase, hemicelulase, pectinase e celubiase, as quais podem converter os componentes lignocelulósicos em compostos que possam ser assimilados pelas hifas (MOORE-LANDECKER, 1992; BUSWELL *et al.*, 1996).

A lignocelulose é o componente orgânico mais abundante no ambiente (TANESAKA, MASUDA & KINUGAWA, 1993). Cerca de 30% do material vegetal é composto por lignina, cuja função é dar integridade à célula vegetal, e também proteger a celulose da parede contra a ação de microorganismos, já que esta molécula apresenta maior resistência à degradação devido à complexidade da sua estrutura (ORTH, ROYSE & TIEN, 1993; SARIKAYA & LADISCH, 1999). Os fungos causadores de podridão branca produzem enzimas oxidativas que são responsáveis pela degradação dos compostos fenólicos, não fenólicos e anéis aromáticos da lignina. As espécies de fungos pertencentes a este grupo são as principais decompositoras da lignina da parede celular no ambiente (YOUN, HAH & KANG, 1995; GUILLÉN *et al.*, 2000). Já os fungos causadores de podridão castanha decompõem preferencialmente a celulose, promovendo porosidade e erosão nas células vegetais, que são causadas pela ação de enzimas hidrolíticas, sem necessariamente degradarem a lignina (VYAS, VOLC & SASEK, 1994; YOUN *et al.*, 1995; DURÁN & ESPOSITO, 1997). Espécies de *Agaricus* desenvolvem-se em substratos lignocelulósicos, como bagaço de cana e palhas

vegetais, motivo por que são denominados também de fungos “degradadores de palha”. No entanto, TANESAKA *et al.* (1993) verificaram que *Agaricus abruptibulbus* Peck, que também se desenvolve em palha, produziu enzimas oxidativas capazes de decompor a lignina presente nestes substratos.

A atividade enzimática pode permitir a diferenciação entre estirpes de microorganismos. SEMEDO *et al.* (2000) avaliaram a atividade enzimática das celulases de *Streptomyces* sp. e observaram uma diferença sete vezes maior na atividade de uma das estirpes com relação à outra, possibilitando diferenciá-las.

A diferença no perfil enzimático de estirpes fúngicas é resultado de variabilidade genética intraespecífica, freqüentemente analisada por meio de técnicas moleculares como o PCR-RFLP e o RAPD. Estirpes de *Agaricus brunnescens* Peck. distantes geograficamente já foram separadas por estas técnicas, possibilitando a seleção de estirpes mais adaptadas a condições ambientais específicas ou resistentes a patógenos (HINTZ, ANDERSON & HORGAN, 1989; KERRIGAN *et al.*, 1999). A criação de híbridos com características mais vantajosas comercialmente e a marcação de estirpes com características comerciais interessantes resultam de estudos com esses marcadores moleculares, como já foi observado para várias espécies de *Pleurotus* (Fr.) QuéL. (IRAÇABAL, ZERVAKIS & LABARÈRE, 1995), para *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (ZHANG & MOLINA, 1995; HUANG, HUNG & WANG, 1999) e para *A. brunnescens* (STOOP & MOOIBROEK, 1999).

Não existem informações sobre a fisiologia e bioquímica da utilização dos componentes lignocelulósicos por *A. blazei*. No entanto, os resultados obtidos anteriormente (capítulo 3) evidenciaram diferenças na capacidade das estirpes para crescer *in vitro*, assim como na colonização de composto comercial. O presente trabalho teve como objetivos detectar diferenças na atividade enzimática de estirpes de *A. blazei*, além de caracterizar o perfil enzimático da espécie, assim como avaliar a variabilidade genética intraespecífica utilizando as técnicas moleculares de PCR-RFLP e RAPD, em decorrência das diferenças observadas anteriormente.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Perfil e atividade enzimática de estirpes de *A. blazei* em composto**

As amostras de composto foram coletadas no experimento realizado conforme descrição no capítulo 2, anteriormente à colocação da camada de cobertura, isto é, no final da fase de corrida micelial (30 dias após a inoculação). Adicionalmente, um tratamento com composto esterilizado foi realizado utilizando-se apenas estirpe 24. Erlenmeyers contendo 10 g de composto foram

esterilizados em autoclave e inoculados com a estirpe 24 crescendo em meio AEM. Foram feitas duas repetições e os Erlenmeyers foram incubados a 28°C durante 85 dias, quando o composto foi totalmente colonizado pelo micélio e foram, então, realizadas as determinações enzimáticas. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Cogumelos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP), UFSC.

Para a determinação de lacase, peroxidase, lignina peroxidase, FPAses e xilanase, uma extração das amostras foi preparada usando 1 g do composto colonizado com 50 mL dos respectivos tampões e esta mistura foi mantida sob agitação por 1 hora, antes de ser filtrada através de filtro Millipore. Para a determinação da atividade de manganês peroxidase, 1 g do composto colonizado foi misturado com 20 mL do tampão. A presença de enzimas oxidativas (lacase, peroxidase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) e hidrolíticas (celulase e xilanase) no composto foi determinada utilizando-se as seguintes metodologias:

A atividade de lacase (EC 1.10.3.2) foi determinada usando como substrato a o-dianisidina, segundo metodologia modificada de SZKLARZ *et al.* (1989). Este método baseia-se na oxidação do substrato enzimático o-dianisidina até a sua forma quinona, que apresenta absorção em 460 nm ( $\epsilon = 29400 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Foram misturados 1 mL do caldo de extração a 0,6 mL de tampão citrato-fosfato (0,2 mol.L<sup>-1</sup> fosfato – 0,1 mol.L<sup>-1</sup> citrato) e 0,2 mL de o-dianisidina 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> a um pH ajustado para 5,0. Em seguida o volume final foi completado para 2,0 mL com 0,2 mL de água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por  $\text{min}^{-1}$ .

Para se determinar a atividade de peroxidase, foi utilizado o mesmo método empregado para determinar lacase, porém foram adicionados 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4,5mM) no meio reacional (SZKLARZ *et al.*, 1989). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por  $\text{min}^{-1}$ .

A atividade de manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) foi determinada segundo metodologia modificada de KUWAHARA *et al.* (1984). Em 500  $\mu\text{L}$  do caldo de extração foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução estoque (0,1%) de vermelho de fenol, 100  $\mu\text{L}$  de lactato de sódio (250 mmol L<sup>-1</sup>), 200  $\mu\text{L}$  de albumina bovina (0,5%), 50  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganês (2 mmol L<sup>-1</sup>) e 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mmol L<sup>-1</sup>) em tampão succinato (20 mmol L<sup>-1</sup>) a pH 4,5. A solução resultante foi incubada por 5 minutos a 30°C e a reação foi interrompida pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de NaOH (2 mol L<sup>-1</sup>). A absorbância foi medida a 610 nm. Uma unidade de manganês peroxidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0  $\mu\text{mol}$  de vermelho de fenol por mL por minuto, utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 4460 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

A atividade da lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico, segundo metodologia modificada de TIEN & KIRK (1984). Foram misturados 250  $\mu\text{L}$  de caldo de extração a 450  $\mu\text{L}$  de água destilada, 375  $\mu\text{L}$  de tampão tartarato de sódio 0.33 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 3,0), 125  $\mu\text{L}$  de uma solução de álcool veratrílico 4,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mmol  $\text{L}^{-1}$ . O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado medindo-se a absorbância a 310 nm ( $\epsilon = 9300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade de lignina peroxidase correspondeu à quantidade de enzima que oxidou 1,0  $\mu\text{mol}$  de álcool veratrílico por minuto por mL.

A atividade de celulases, chamadas FPases (*Fiber Paper Activity*) (EC 3.2.1.4) foi determinada incubando-se tiras de papel de filtro (Watman nº 1) com 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 a 50°C por 60 minutos (MANDELS *et al.*, 1976). A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959). Uma curva padrão foi obtida a partir da glicose (1 a 5 mM). Definiu-se uma unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto a 50°C.

A atividade de xilanase extracelular (EC 3.2.1.8 / EC 3.2.1.32 / EC 3.2.1.136) foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da xilana, de acordo com o método de DNS (MILLER, 1959). Uma solução de xilana foi preparada a partir de 1g de xilana comercial tipo *birchwood* dissolvida em 80 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,3. A solução foi aquecida até a ebulição e após retornar a temperatura ambiente o volume foi completado para 100 mL com o mesmo tampão. Um volume de 0,9 mL de xilana 1% foi colocado em tubos de ensaio e incubado a 50°C durante 5 minutos. Em seguida foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  de amostra contendo a enzima apropriada diluída no tampão. Após 5 minutos adicionaram-se 1,5 mL do reagente DNS. A determinação foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por MILLER (1959). A curva padrão foi estabelecida a partir de xilose (MERCK), nas concentrações entre 2 e 10  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . Uma unidade de atividade enzimática correspondeu à quantidade da enzima capaz de catalisar a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor expresso por quantidade de xilose por mL por minuto a 50°C.

A atividade enzimática foi expressada em quatro intervalos, sendo que cada um representou uma determinada faixa de atividade, sendo eles: - = 0 U/mL; + = 1-300 U/mL; ++ = 301-500 U/mL; +++ = > 501 U/mL.

## 2.2 Variabilidade genética de estirpes de *A. blazei* utilizando-se as técnicas de PCR-RFLP e RAPD

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Genética, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### 2.2.1 Extração de DNA total

A produção de micélio para a extração do DNA foi feita após o cultivo das seis estirpes de *A. blazei* em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de caldo extrato de malte com peptona de soja (CEMp), constituído por 30 g de extrato de malte (Merck), 3 g de peptona de soja, 1000 mL de água destilada. Este caldo foi inoculado com discos de micélio de 7 mm de diâmetro retirados da borda de colônias de três semanas de cada estirpe crescidas em AEMp. Os frascos foram incubados em BOD a 28°C até o desenvolvimento do micélio. A extração do DNA total do micélio dicariótico fresco foi realizada segundo um protocolo denominado extração em pequena escala, de acordo com as técnicas descritas por SCHÄFER, WÖSTEMEYER & RANDOM (1992), modificadas por JUNGHANS *et al.* (1998). A concentração de DNA foi estimada pela comparação com DNA do fago Lambda em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (0,6 µg/mL).

### 2.2.2 Amplificação por PCR e análise por RFLP

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região ITS do rDNA (Tabela 1) foram descritos por WHITE *et al.* (1990). Os componentes para 25 µL de reação foram: DNA total 10 ng, 0,2 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, Tris HCl (pH 8,3) 10 mM, 50 mM de KCl, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 100 mM de cada um dos deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador PTC - 100 (MJ Research, Inc.) programado com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos, seguidos de uma extensão final a 72°C por dez minutos. Após a amplificação, os produtos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). O DNA do fago φX174 clivado com a enzima *Hae* III foi usado como marcador padrão para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados. Os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados adicionando-se NaCl 0,1M e etanol, em centrifuga, para análise por RFLP. Após ressuspender as amostras em água MilliQ, o precipitado foi clivado com três diferentes enzimas de restrição, *Alu* I, *Hha* I e *Hinf* I. Os fragmentos de DNA resultantes da clivagem foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo (0,6 µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta com uma câmara Polaroid ou digitalizados em um sistema de vídeo *Eagle Eye*



(Stratagene®). O DNA do fago  $\phi$ X174 clivado com a enzima *Hae* III foi usado como marcador padrão de tamanho.

Tabela 1: Seqüência de bases dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região ITS do rDNA

Oligonucleotídeos	Seqüência
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

### 2.2.3 Análise do DNA por RAPD

Para a análise por RAPD foram utilizados 10 oligonucleotídeos iniciadores com diferentes seqüências aleatórias (Tabela 2). As amostras foram amplificadas em um termociclador PTC – 100 (MJ Research, Inc.) programado para 40 ciclos com a seguinte seqüência tempo/temperatura: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Após os 40 ciclos seguiu-se uma etapa de 7 minutos a 72°C e então a temperatura foi reduzida a 4°C até a retirada das amostras do equipamento. Após a amplificação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo (0,6  $\mu$ g/mL). O DNA do fago  $\phi$ X174 clivado com a enzima *Hae* III foi usado como marcador padrão de tamanho de bandas. Após a eletroforese, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com uma câmara Polaroid ou digitalizados em um sistema de vídeo *Eagle Eye* (Stratagene®).

Os resultados obtidos foram tabulados utilizando-se os códigos 1 ou 0 para a presença ou ausência de um determinado fragmento de DNA no gel. A distância genética entre as estirpes foi calculada de acordo com NEI & LI (1979) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$S_{ij} = 1 - \frac{2N_{ij}}{(N_i + N_j)}$$

onde  $S_{ij}$  é a distância genética entre dois genótipos,  $N_{ij}$  as bandas comuns aos dois genótipos e  $N_i$  e  $N_j$  o número de bandas nos genótipos  $i$  e  $j$  respectivamente.

Foi utilizado o programa GENES (CRUZ, 1997) para cálculo e obtenção da matriz de dissimilaridade genética. A matriz quadrada foi utilizada para construção do dendrograma, onde os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), desenvolvido por SOKAL & MICHENER (1958).

Tabela 2: Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, com as respectivas seqüências de bases

Oligonucleotídeos	Seqüência 3' → 5'
OPF-01	ACGGATCCTG
OPF-02	GAGGATCCCT
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-06	GGGAATTCGG
OPF-08	GGGATATCGG
OPF-09	CCAAGCTTCC
OPF-10	GGAAGCTTGG
OPF-12	ACGGTACCAG
OPF-13	GGCTGCAGAA
OPF-14	TGCTGCAGGT

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Perfil e atividade enzimática de *Agaricus blazei*

As enzimas produzidas nos compostos colonizados com as seis estirpes de *A. blazei* foram as seguintes: lacase, peroxidase, manganês peroxidase e FPAses. Não foi detectada a presença de lignina peroxidase e de xilanase pelos métodos utilizados. A Tabela 3 apresenta os resultados do perfil e atividade enzimática das estirpes crescidas em composto não esterilizado no final da corrida micelial (30 dias após a inoculação), no controle com composto não esterilizado não inoculado e no composto esterilizado inoculado com a estirpe 24.

As estirpes apresentaram atividade mais alta de lacase e manganês peroxidase no composto não estéril do que no composto estéril. Este resultado pode ter sido devido à presença de outros microorganismos no composto que contribuíram para a produção dessas enzimas ou cuja atividade no composto foi favorável à expressão daquelas enzimas pelo micélio de *A. blazei*. Além disso, a atividade microbiana que atuou no composto antes da colonização por *A. blazei* pode ter beneficiado o desenvolvimento deste fungo, pela degradação parcial do substrato.

O gênero *Agaricus* normalmente apresenta produção significativa de lacase e celulase, como já foi observado em *A. brunnescens*. Estas enzimas estão relacionadas com o ciclo de vida do fungo e a sua concentração no substrato pode estar associada ao controle da produção de basidiomas, sendo que a monitoração destas enzimas no composto pode servir como indicativo da época de formação dos primórdios, indicando a necessidade de manejo apropriado para a indução da fase de frutificação (TURNER, 1974; BONNEN *et al.*, 1994; TAN & WAHAB, 1997; OHGA *et al.*, 1999).

Já foram detectadas também em *A. brunnescens* a produção de peroxidase, Mn peroxidase, tirosinase, carbohidrase e proteinases relacionadas com a mobilização do nitrogênio (TURNER, 1974; RATCLIFFE *et al.*, 1994; BAARS *et al.*, 1994; BONNEN *et al.*, 1994; MATA & SAVOIE, 1998). A atividade de lignina peroxidase também não foi detectada em cultivo de *A. brunnescens* nos estudos realizados por BONNEN *et al.* (1994).

Tabela 3: Perfil e atividade enzimática das seis estirpes comerciais de *A. blazei*.

Tratamentos <sup>1</sup>	Enzimas <sup>2</sup>					
	Lac	Per	MnP	LiP	FPA	Xil
Estirpe 21 s.n.e.	+ <sup>3</sup>	+	+++	-	+	-
Estirpe 22 s.n.e.	+	+	+++	-	+	-
Estirpe 23 s.n.e.	+	+	+++	-	+	-
Estirpe 24 s.n.e.	+	+	+++	-	+	-
Estirpe 33 s.n.e.	+	+	+++	-	+	-
Estirpe 34 s.n.e.	+	+	++	-	+++	-
Composto não inoculado	-	-	+	-	++	-
Estirpe 24 s.e.	+	+	+	-	+	-

<sup>1</sup> s.n.e. = substrato não esterilizado; s.e. = substrato esterilizado.

<sup>2</sup> Lac=lacase, Per=peroxidase, MnP=manganês peroxidase, LiP=lignina peroxidase, FPA=FPAses, Xil=xilanase.

<sup>3</sup> Atividade enzimática: - = 0; + = 1-300 U/mL; ++ = 301-500 U/mL; +++ = > 501 U/mL.

### 3.2 Análise genética

O protocolo utilizado permitiu extrair eficientemente o DNA total de todas as estirpes de *A. blazei*. A eletroforese em gel de agarose revelou um fragmento que correspondeu a 25 ng para a estirpe 22, 50 ng para a estirpe 24, 150 ng para a estirpe 34 e 200 ng para as estirpes 21, 23 e 33 (Figura 1). As diferenças na quantidade de DNA entre as estirpes são devido à eficiência no rendimento de extração do DNA total.

#### 3.2.1 PCR-RFLP da região ITS

A região ITS do rDNA foi amplificada em todas as seis estirpes resultando em um único fragmento de DNA entre 603 e 872 pb (Figura 2), não existindo polimorfismo de tamanho para esta região entre as seis estirpes. Para determinar a existência ou não de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, os produtos da amplificação da região ITS foram

esta região entre as seis estirpes. Para determinar a existência ou não de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, os produtos da amplificação da região ITS foram clivados com as enzimas de restrição *AluI*, *HaeI* e *HinfI*. A Figura 3 mostra o padrão obtido com estas enzimas, o qual não possibilitou distinguir as seis estirpes de *A. blazei*. Estes resultados indicam que também não existe polimorfismo de restrição na seqüência ITS entre as seis estirpes estudadas com relação às enzimas *AluI*, *HaeI* e *HinfI*. A ausência de polimorfismo nesta região é importante do ponto de vista taxonômico e confirma o fato de que todas as estirpes pertencem à uma mesma espécie.

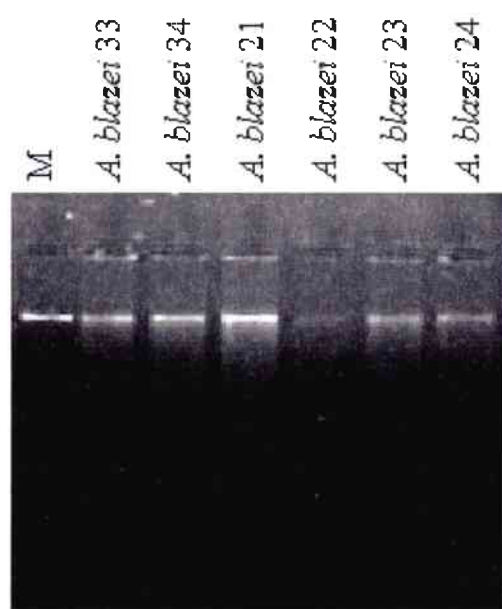


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA total de seis estirpes de *A. blazei*. M – 25 ng do DNA do fago Lambda.

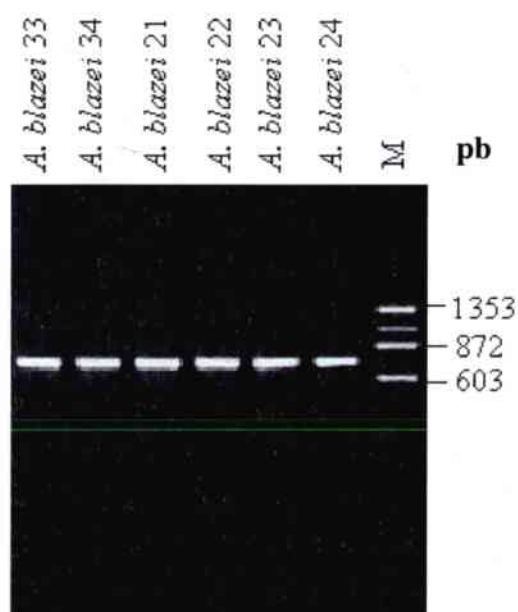


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação da região ITS do rDNA de seis estirpes de *A. blazei*. M – Marcador  $\phi$ X 174 clivado com a enzima *Hae III*.

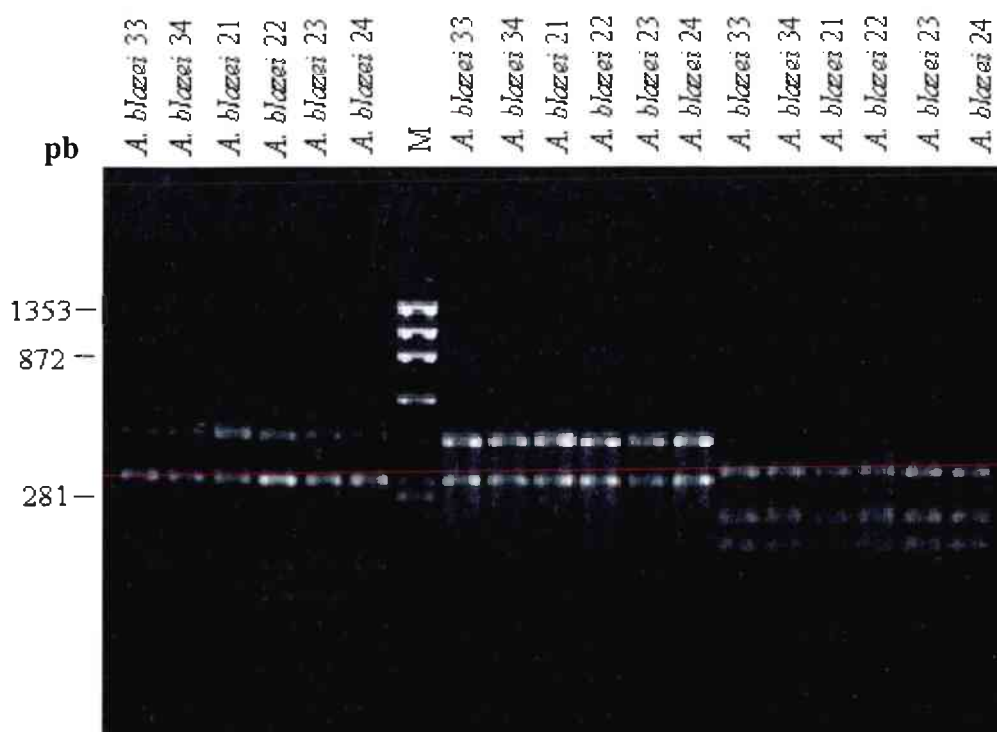


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 2,0% da clivagem da região ITS do rDNA de seis estirpes de *A. blazei* com as enzimas de restrição *Alu* I, *Hha* I e *Hinf* I. M – Marcador  $\phi$ X 174 clivado com a enzima *Hae* III.

Polimorfismos entre estirpes selvagens e cultivadas de *A. brunnescens* foram detectados por LOFTUS, MOORE & ELLIOTT (1988). Foram utilizados clones aleatórios do DNA de *A. brunnescens* e os resultados sugeriram que os RFLPs poderiam formar uma base para a caracterização genética das estirpes que, subsequenteiramente poderiam servir para proteção das estirpes. O uso de marcadores RFLP para diferenciar estirpes de *A. brunnescens*, *Agaricus bitorquis* (Quélet) Sacc. e *Agaricus campestris* L.: Fr. foi analisado também por HINTZ, ANDERSON & HORGEN (1989). Estes autores clonaram e mapearam o rDNA de *A. brunnescens* para seis enzimas de restrição e este mapa foi usado como comparação para as demais estirpes (seis de *A. brunnescens*, cinco de *A. bitorquis* e três de *A. campestris*). Neste caso, o padrão encontrado para as seis estirpes de *A. brunnescens* foi idêntico, enquanto *A. bitorquis* e *A. campestris* foram subdivididos em dois outros grupos. KERRIGAN *et al.* (1999) estudaram estirpes de *Agaricus subfloccosus* (Lange) Pilát. da Europa e da América do Norte originários de regiões costeiras e de regiões de maiores altitudes. Os autores encontraram diferenças genotípicas baseadas na análise de RFLP entre os dois grupos distintos geograficamente, não importando de qual continente as estirpes haviam sido originadas. Os resultados de polimorfismo, neste caso, foram comparados e apresentaram equivalência de características morfológicas e culturais analisadas nas mesmas estirpes.

Em um trabalho com culturas de *Agaricus* da seção Arvenses (CALVO-BADO *et al.*, 2000), dois grupos foram separados por RFLP da região ITS. Estes grupos foram consistentes com os morfotipos relacionados às culturas estudadas. No entanto, dentro de um dos grupos as seqüências foram idênticas para todas as estirpes. No segundo grupo houve uma variação de apenas 4,3% nas seqüências das estirpes.

### 3.2.2 RAPD

No estudo dos fragmentos obtidos por RAPD utilizando 10 oligonucleotídeos iniciadores, um total de 55 fragmentos de DNA foram amplificadas. Os 15 fragmentos de DNA considerados para a análise eram polimórficos. A Figura 4 mostra os padrões de amplificação obtidos com os iniciadores OPF 10, OPF 12 e OPF 13. O número de fragmentos de DNA por oligonucleotídeo variou entre 5 e 9, com uma média de 7,5. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram entre 271 e 1353 pb.

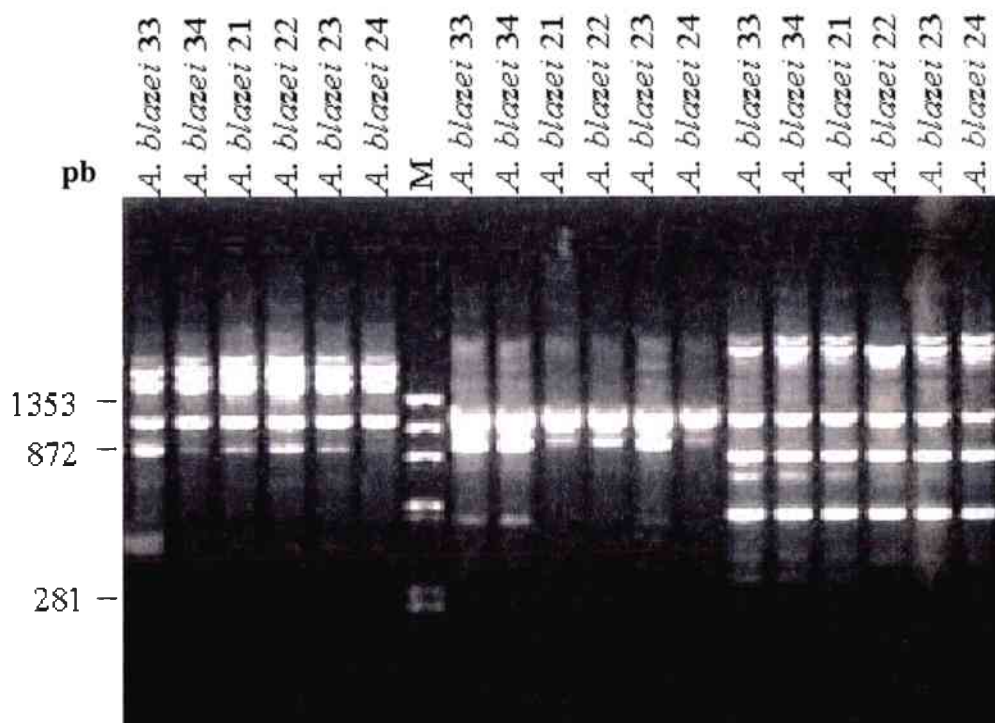


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de fragmentos de DNA amplificados com o uso dos oligonucleotídeos OPF 10, OPF 12 e OPF13 para seis estirpes de *A. blazei*. M -  $\phi$ x 174 clivado com *Hae* III.

A dissimilaridade genética entre as estirpes (Tabela 3) variou de 0,0% (estirpes 33 e 34) a 14% (estirpes 22 e 33; 22 e 34). No dendrograma obtido por UPGMA (Figura 6), dois grupos foram distintos, apresentando distância de 11,8%. A estirpe 22 foi a mais distante dentre as

estirpes analisadas. As outras cinco estirpes formaram um grupo maior, que pode ser subdividido em dois grupos menores. As estirpes 21 e 24 estão mais relacionadas entre si (2%) e estão separadas do grupo das estirpes 23, 33 e 34 por uma distância de aproximadamente 4%. As estirpes 33 e 34 foram idênticas entre si para todas as bandas RAPD analisadas.

Tabela 4: Matriz de dissimilaridade genética entre as seis estirpes de *A. blazei*. Distância genética de NEI & LI (1979).

	<i>A. blazei</i> 33	<i>A. blazei</i> 34	<i>A. blazei</i> 21	<i>A. blazei</i> 22	<i>A. blazei</i> 23	<i>A. blazei</i> 24
<i>A. blazei</i> 33	0,000					
<i>A. blazei</i> 34	0,000	0,000				
<i>A. blazei</i> 21	0,030	0,030	0,000			
<i>A. blazei</i> 22	0,146	0,146	0,116	0,000		
<i>A. blazei</i> 23	0,020	0,020	0,051	0,128	0,000	
<i>A. blazei</i> 24	0,051	0,051	0,020	0,097	0,031	0,000

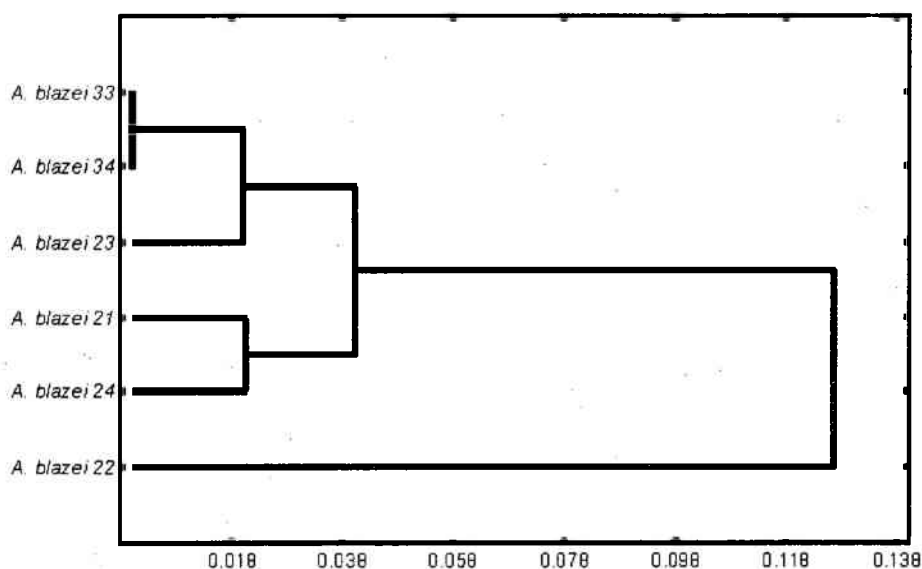


Figura 5: Dendrograma obtido com base nas distâncias genéticas da Tabela 3.

A determinação de polimorfismo entre estirpes de *L. edodes* foi detectada por ZHANG & MOLINA (1995) e por HUANG, HUNG & WANG (1999). No primeiro trabalho, quinze estirpes foram estudadas, das quais, treze apresentaram características de RAPD únicas. No trabalho de HUANG *et al.* (1999), 25 estirpes de *L. edodes* comercializadas em Taiwan foram diferenciadas e agrupadas segundo as características de RAPD encontradas. Os marcadores RAPD obtidos nos estudos de HUANG *et al.* (1999) puderam ser usados para diferenciar as estirpes de *L. edodes*,

estudos de HUANG *et al.* (1999) puderam ser usados para diferenciar as estirpes de *L. edodes*, além de ter aplicações potenciais na reprodução dos fungos, na identificação genética e no melhoramento das estirpes comerciais.

#### 4 Conclusões

- ◆ A determinação da atividade enzimática não permitiu a diferenciação das estirpes selecionadas. Entretanto, foi relatado pela primeira vez o perfil enzimático de *A. blazei* em composto comercial. A espécie apresentou um perfil que se assemelha ao perfil de outras espécies de *Agaricus* mais estudadas, produzindo enzimas oxidativas como lacase e manganês peroxidase, ambas importantes no processo de degradação da lignina.
- ◆ A análise da região ITS do rDNA não permitiu detectar polimorfismo entre as estirpes analisadas com as três enzimas de restrição utilizadas.
- ◆ Na análise de polimorfismo por meio da técnica de RAPD, a estirpe 22 foi a que apresentou a maior dissimilaridade (próxima de 12%), sugerindo a existência de uma estirpe que se diferencia das demais.



## CAPÍTULO 5

# Avaliação preliminar da produtividade de estirpes de *Agaricus blazei* Murrill e obtenção de basidiomas em sistema de cultivo experimental

### 1 Introdução

O cultivo de *Agaricus blazei* Murrill tem despertado grande interesse mundial recentemente, e países como Japão e Estados Unidos são importadores desta espécie, cujo maior produtor é o Brasil. A demanda para este cogumelo é devida às propriedades medicinais potenciais já relatadas, como a atividade antioncogênica (MIZUNO, 1999). No Brasil, o cultivo iniciou no final da década de 90 e vem crescendo principalmente devido ao alto valor deste produto no exterior. No entanto, por ser uma atividade recente, não existem pesquisas científicas ou tecnológicas desenvolvidas para a espécie, e seu cultivo se baseia nas técnicas definidas para *Agaricus brunnescens* Peck., espécie de região temperada. Este fato é responsável pela baixa produtividade de *A. blazei*, tornando este cultivo uma atividade de risco para o pequeno e médio produtor (BRAGA & EIRA, 1999).

O cultivo de *Agaricus* é uma atividade complexa que envolve diversas etapas, iniciando com a produção do inoculante, cuja qualidade depende da estirpe selecionada e das condições de preparo, passando pela compostagem e pasteurização do substrato, preparo da camada de cobertura e controle ambiental e manejo do cultivo (STAMETS, 1983; RINKER, 1993).

IWADE & MIZUNO (1997), cultivando uma estirpe de *A. blazei*, observaram um maior crescimento vegetativo na faixa de temperatura entre 22°C e 26°C, com umidade relativa do ar entre 60% e 75%, sendo que para o desenvolvimento de basidiomas a faixa ideal de temperatura foi entre 22°C e 25°C e a umidade entre 70% e 85%. O pH ideal da camada de cobertura para o cultivo dessa estirpe foi de 7,0.

BRAGA *et al.* (1998) sugeriram uma faixa de temperatura entre 25°C e 30°C durante a fase de produção de basidiomas e observaram que temperaturas acima de 30°C ou abaixo de 15°C inibiram a produção. A temperatura mínima limitante para a produção de basidiomas evidenciou uma das diferenças existentes entre o cultivo de *A. blazei* e de *A. brunnescens* (BRAGA, 1999), cuja temperatura ótima para a produção de basidiomas é na faixa de 16°C a 20°C (RINKER, 1993).

Geralmente o micélio de *A. blazei* coloniza o substrato de cultivo ao final de 20 a 25 dias (IWADE & MIZUNO, 1997; BRAGA *et al.*, 1998). Ao final da fase de colonização, ou corrida micelial, é adicionada uma camada de cobertura sobre o composto miceliado. Esta camada proporciona as alterações ambientais necessárias à passagem do micélio da fase vegetativa para a

reprodutiva (STAMETS, 1983; RINKER, 1993). O micélio de *A. blazei* leva em torno de 20 dias para colonizar o substrato da camada de cobertura, porém este período pode variar com a umidade desta camada, com a temperatura, com a concentração de CO<sub>2</sub> e com a espessura. Camadas de cobertura com 5 ou 8 cm de espessura proporcionaram maior produtividade quando comparadas com uma camada de apenas 3 cm em ambiente de cultivo protegido (BRAGA & EIRA, 1999).

A camada de cobertura tem grande influência na produtividade do cultivo, e os materiais que a compõem devem ser cuidadosamente selecionados de forma a propiciar o maior crescimento do micélio e a produção de basidiomas. O material a ser utilizado deve ter capacidade para reter água, porém com porosidade adequada para permitir trocas gasosas, não devendo apresentar populações elevadas de microorganismos contaminantes, mas possuir a microbiota benéfica ao micélio fúngico. As funções básicas desta camada são proteger o composto miceliado contra a perda de umidade, formar um microclima úmido para a formação dos primórdios e desenvolvimento do basidioma, servir como reservatório de água para os cogumelos maduros e favorecer o crescimento de microorganismos benéficos ao cogumelo (STAMETS, 1983; REDDY & PATRICK, 1990; BONONI *et al.*, 1993). Esta camada é suscetível às condições ambientais externas, o que torna importante o manejo, principalmente da temperatura e da umidade relativa do ar do ambiente de cultivo, assim como da ventilação, para que o microclima dessa cobertura não seja alterado (KALBERER, 1990; BRAGA, 1999).

Após a colonização da camada de cobertura pelo micélio fúngico, deve-se iniciar o período de indução, o qual geralmente envolve diversos fatores, tais como estresse nutricional, redução da concentração de CO<sub>2</sub> através da entrada forçada de ar fresco e abaixamento da temperatura do ar e do composto (RINKER, 1993). Para *A. blazei*, no entanto, não existem informações sobre os fatores que atuam no processo de indução.

O cultivo realizado em ambiente fechado, embora possibilite melhor controle das condições ambientais e uma produção por período prolongado, pode propiciar um aumento indesejável na temperatura, além de reter maior umidade se o controle destas variáveis não for rigoroso.

Este trabalho teve como objetivo principal a produção de basidiomas para a realização da identificação taxonômica, assim como a obtenção de novas culturas a partir dos basidiomas produzidos (Capítulo 2). Paralelamente, foram avaliadas a produtividade e a eficiência biológica das seis estirpes estudadas, visando detectar diferenças entre estas estirpes comerciais. Foram analisadas ainda as técnicas de cultivo e controle ambiental utilizadas pelos produtores de *A. blazei* da região de Florianópolis, SC.

## 2 Material e métodos

O experimento de cultivo foi realizado na propriedade do Sr. Lourenço, localizada em Ratonos Grande, Florianópolis, SC, e envolveu seis estirpes comerciais selecionadas em diversas regiões do país. A produção de inoculante, de composto e o preparo da camada de cobertura foram apresentados no capítulo 2 deste trabalho.

### 2.1 Colheita dos basidiomas e avaliação da produtividade

Os cogumelos foram colhidos manualmente antes da abertura do píleo e em seguida foram limpos para a retirada da terra aderida à base do estipe e, então, foram transportados ao Laboratório de Cogumelos para serem pesados e medidos. A secagem foi feita a 50°C em estufa com ventilação por aproximadamente 24 horas. Os cogumelos foram novamente pesados depois de secos e então foram acondicionados em sacos de papel.

Para calcular a produtividade do cultivo foram utilizados o índice de produtividade e o de eficiência biológica utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Produtividade (P)} = \frac{\text{massa seca cogumelos produzidos}}{\text{massa seca composto}} \times 100$$

$$\text{Eficiência Biológica (EB)} = \frac{\text{massa fresca cogumelos produzidos}}{\text{massa seca composto}} \times 100$$

## 3 Resultados e discussão

O micélio de *A. blazei* colonizou o composto ao final de 30 dias, quando o substrato apresentou-se como um bloco consistente, com crescimento micelial vigoroso de coloração branca e com odor adocicado característico. Quando os sacos foram abertos para instalar o experimento foram constatados pontos de contaminação por *Trichoderma* no interior do composto. Possivelmente a contaminação foi resultante de um processo de compostagem ineficiente, já que o foco de *Trichoderma* foi interno ao substrato e a presença de espécies deste fungo é um indicativo da má qualidade do composto (RINKER, 1993, CASTLE *et al.*, 1998).

A camada de cobertura foi colonizada pelo micélio ao final de 20 dias, quando, então, a temperatura e a ventilação foram aumentadas no interior da estufa para induzir a formação de primórdios, o que ocorreu após 6 dias. Os cogumelos colhidos apresentaram massa fresca média de 13,7 g e a altura média foi de 5,12 cm. No entanto, a produção neste cultivo experimental foi baixa, sendo que nenhuma das estirpes apresentou produtividade superior a 1%, e a eficiência biológica mais alta não passou de 6,5% (Tabela 1).

Tabela 1: Índices de produtividade e eficiência biológica (em %) de seis estirpes comerciais de *A. blazei*, obtidos em cultivo experimental protegido.

<i>Estirpes</i>	<b>Basidiomas (número)</b>	<b>Produtividade (%)</b>	<b>Eficiência biológica (%)</b>
21	62	0,96	6,24
22	16	0,86	5,15
23	39	0,58	3,42
24	48	0,52	2,72
33	03	0,08	0,51
34	60	0,67	3,78

Dentre os fatores que influenciaram negativamente o cultivo experimental realizado sob as condições praticadas comercialmente em Florianópolis, podem ser ressaltados a qualidade do solo utilizado na camada de cobertura, as características da estufa de cultivo e o manejo das condições ambientais, principalmente a umidade e a ventilação. O solo de textura franco-siltosa utilizado pelos produtores locais reteve água em demasia, sem propiciar a porosidade necessária para a ocorrência de trocas gasosas. A mistura de areia grossa ao solo e a colocação de pedriscos sob a camada de cobertura não foram suficientes no sentido de melhorar a porosidade desta camada. O piso de carvão interno à estufa absorveu umidade durante o dia, o que impossibilitou o controle durante a noite, quando a umidade ultrapassou os 98%, situação que freqüentemente ocorreu durante 12 horas contínuas. Além disso, o controle da temperatura, que nas horas mais quentes do dia ultrapassou os 30°C por falta de um sombrite, exigia, além da ventilação, o uso dos aspersores laterais, aumentando ainda mais a umidade interna.

O manejo inadequado resultante de uma infra-estrutura inapropriada, resultou que ao final de cinco dias após a colocação da camada de cobertura, os canteiros apresentaram, na superfície, contaminação por *Trichoderma* sp., provavelmente resultante da disseminação dos pontos de contaminação iniciais e pelas condições de umidade elevadas no interior da estufa. A espécie de *Trichoderma* contaminante deste cultivo foi identificada como sendo *Trichoderma harzianum* Rifai, também encontrada na América Central e do Norte (BISSETT, comunicação pessoal).

A fase de colonização do substrato e da camada de cobertura observados em nosso experimento coincidiram com aqueles observados por BRAGA *et al* (1998) e por BRAGA & EIRA (1999) também em cultivos protegidos. No entanto, a dificuldade no controle da umidade e das temperaturas internas da estufa propiciou o desenvolvimento de *Trichoderma*, um fungo presente

no solo e em matéria orgânica e que reduz a produtividade do cultivo, inibindo o crescimento do micélio de *Agaricus*, afetando negativamente a qualidade dos cogumelos produzidos (RINKER, 1993, CASTLE *et al.*, 1998).

#### 4 Conclusões

- ◆ O cultivo experimental das seis estirpes de *A. blazei* foi fundamental para a produção dos basidiomas utilizados na identificação taxonômica, possibilitando, ainda a obtenção de novas culturas.
- ◆ Não foi possível estabelecer diferenças quanto aos índices de produtividade das estirpes, visto que as condições de infra-estrutura e de manejo utilizados no cultivo não possibilitaram o desenvolvimento adequado dos basidiomas.
- ◆ Foi evidenciada, neste experimento preliminar, a necessidade de otimizar as técnicas de manejo, controle ambiental e infra-estrutura, assim como a qualidade do composto produzido na região. O cultivo protegido envolve um controle ambiental rigoroso, devendo atender aos requisitos do cultivo nas suas diversas fases e em várias épocas do ano.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho constitui o primeiro relato científico envolvendo o estudo da variabilidade intraespecífica de *Agaricus blazei*, o “cogumelo do sol”, abordando avaliações ecológicas, fisiológicas e genéticas. Constatou-se a existência de variabilidade entre as seis estirpes comerciais selecionadas, sendo possível separar dois grupos de acordo com as características observadas. O primeiro grupo foi constituído por cinco estirpes que apresentaram diferenças menores entre si, enquanto o segundo grupo envolveu apenas a estirpe 22, que apresentou características mais distintas das demais, sobretudo no que se refere às avaliações ecológicas e à análise do DNA por RAPD.

Uma vez que este trabalho envolveu seis estirpes e os resultados sugerem que cinco foram identificadas como um grupo mais homogêneo, existe a possibilidade de uma única estirpe de *A. blazei* estar sendo comercializada no país, paralelamente ao que ocorre com as estirpes comerciais de *A. brunnescens* nos locais onde esta espécie é produzida em maiores quantidades. Com base nos resultados obtidos, torna-se evidente a necessidade de serem efetuadas pesquisas subsequentes utilizando a mesma metodologia, porém avaliando um maior número de estirpes, para que se confirme a utilização de uma única estirpe ou para que se evidencie a variabilidade das estirpes comercializadas. Tais pesquisas terão implicações importantes na instalação de programas de seleção e de melhoramento de estirpes, visando o aumento da produtividade dos cultivos, a maior adaptação das estirpes às diversas regiões do país e o controle de doenças e pragas.

No que se refere à estirpe 22, também foi constatado que seu desempenho, observado em cultivo comercial na região de Florianópolis, apresentou índices de produtividade insatisfatórios. Desta forma, fica clara a necessidade de se estabelecer programas de seleção de estirpes previamente à produção de inoculantes. Neste sentido, este trabalho proporcionou, ainda, a metodologia básica para o desenvolvimento de métodos de seleção em escala laboratorial, previamente aos experimentos em escala piloto nesses programas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOVIĆ, M.; GRUBIĆ, G.; MILENKOVIĆ, I.; JOVANOVIĆ, R.; PROTIC, R.; SRETENOVIĆ, L. & STOICEVIĆ, L. - The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Sci Tech*, **71**: 357-362. 1998.
- AKAMATSU, Y. - Reutilization of culture wastes of *Pleurotus ostreatus* and *Pholiota nameko* for cultivation of *Lyophyllum decastes*. *J Wood Sci*, **44**: 417-420. 1998.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. - *Introductory Mycology*. 4.ed. New York. John Wiley & Sons. 1996. 868p.
- ARORA, D. - *Mushrooms Demystified*. 2.ed. Berkeley. Ten Speed Press. 1986. 959p.
- BAARS, J.J.P.; CAMP, H.J.M.O.; HERMANS, J.M.H.; MIKES, V.; DRIFT, C.; GRIESVEN, L.J.L.D. & VOGELS, G.D. - Nitrogen assimilating enzymes in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, **140**: 1161-1168. 1994.
- BASTIDE, P.Y.; SONNENBERG, A.S.M.; GRIESVEN, L.J.L.D.; ANDERSON, J.B. & HORGAN, P.A. - Mitochondrial haplotype influences mycelial growth of *Agaricus bisporus* heterokaryons. *Appl Environ Microbiol*, **63** (9): 3426-3431. 1997.
- BERTINI, L.; AGOSTINI, D.; POTENZA, L.; ROSSI, I.; ZEPPA, S.; ZAMBONELLI, A. & STOCCHI, V. - Molecular markers for the identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *New Phytologist*, **139**: 565-570. 1998.
- BETTUCCI, L. & GUERRERO, T. - Hongos xilofagos: estudio de cultivos. *Boletín nº118*. Buenos Aires. Facultad de Agronomía. 1971. 40p.
- BJURMAN, J. - Ergosterol as an indicator of mould growth on wood in relation to culture age, humidity stress and nutrient level. *Int Biodeterioration Biodegrad*: 355-368. 1995.
- BONNEN, A.M.; ANTON, L.H. & ORTH, A.B. - Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*, **60** (3): 960-965. 1994.
- BONONI, V.L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R. & TRUFEM, S.F.B. - *Cultivo de Cogumelos Comestíveis*. 2.ed. São Paulo. Ícone. 1995. 206p.
- BOYLE, D. - Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. *Soil Biol Biochem*, **30** (6): 817-823. 1998.
- BRAGA, G.C. & EIRA, A.F. - Efeitos da camada de cobertura, da massa do substrato e do ambiente de cultivo, na produtividade de *Agaricus blazei* Murrill. *Energia na Agricultura*, **14** (1): 39-52. 1999.
- BRAGA, G.C.; EIRA, A.F.; CELSO, P.G. & COLAUTO, N.B. - *Manual do cultivo de Agaricus blazei Murr. "Cogumelo-do-Sol"*. Botucatu. UNESP. FEPAP. 1998. 44p.
- BRAGA, G.C. - Produtividade de *Agaricus blazei* Murrill em função do ambiente de cultivo, massa do substrato e camada de cobertura. Botucatu: Departamento de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP. 1999. 73p. (Tese de doutorado)
- BUNYARD, B.A.; NICHOLSON, M.S. & ROYSE, D.J. - Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Fungal Genet Biol*, **20** (4): 243-253. 1996.
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T.; PEBERDY, J.F.; FU, S.Y. & YU, H.-S. - Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World J Microbiol Biotechnol*, **12**: 537-542. 1996.
- CAPELLI, A. - *Agaricus. Fungi europei*. M. Candusso. Sorono. 1984. 560p.
- CALVO-BADO, L.; NOBLE, R.; CHALLEN, M.; DOBROVIN-PENNINGTON, A. & ELLIOTT, T. - Sexuality and genetic identity in the *Agaricus* section *Arvenses*. *Appl Environ Microbiol*, **66** (2): 728-734. 2000.
- CAMP, H.J.M.; STUMM, C.K.; STRAATSMA, G.; DERIKX, P.J.L. & GRIESVEN, L.J.L.D. - Hyphal and mycelial interactions between *Agaricus bisporus* and *Scytalidium thermophilum* on agar media. *Microbiol Ecology*, **19** (3): 303-309. 1990.
- CASTLE, A.J.; HORGAN, P.A. & ANDERSON, J.B. - Crosses among homokaryons from commercial and wild-collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens* (= *A. bisporus*). *Appl Environ Microbiol*, **54** (7): 1643-1648. 1988.
- CASTLE, A.; SPERANZINI, D.; RGHEI, N.; ALM, G.; RINKER, D. & BISSET, J. - Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Appl Environ Microbiol*, **64** (1): 133-137. 1998.

- CHANG, S.T. - Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21<sup>st</sup> century: nongreen revolution. *Int J Med Mush*, 1: 1-7. 1999.
- COLAUTO, N.B. & EIRA, A.F. - Avaliação quantitativa da comunidade bacteriana na camada de cobertura de *Agaricus bisporus*. *Energia na Agricultura*, 13 (2): 15-27. 1998.
- COURTECUISSÉ, R. & DUHEM, B. - *Guide des champignons de France et d'Europe*. Delachand et Niestlé. 1994.
- CRUZ, C.D. - Programa GENES, aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, UFV. 1997.
- DENADAI, R.; ALVES DE LIMA, P.L.; SALVADORE, D.M.F.; EIRA, A.F.; BAZO, A.P. & RIBEIRO, L.R. - The protective effect of mushroom (*Agaricus blazei*) teas on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. 5<sup>o</sup> Congresso Latinoamericano de Mutagênese e Teratogênese ambiental. Curitiba. 1998. Anais do Congresso: 247.
- DERIKX, P.J.L.; CAMP, H.J.M.; DRIFT, C.; GRIENSVEN, L.J.L.D. & VOGELS, G.D. - Biomass and biological activity during the production of compost used as a substrate in mushroom cultivation. *Appl Environ Microbiol*, 56 (10): 3029-3034. 1990.
- DIX, N.J. & WEBSTER, J. - *Fungal Ecology*. Londres. Chapman & Hall. 1995. 549p.
- DUNCAN, K. - An ecophysiological approach to the evaluation, modification and production of mushroom growing media. *Mush News*: 12-27. 1997.
- DURÁN, N. & ESPOSITO, E. - Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. ed.. *Microbiologia Ambiental*. São Paulo. Embrapa. 1997. p.269-292.
- EGUCHI, F.; YOSHIMOTO, H. & HIGAKI, M. - A year-round cultivation method of *Agaricus blazei* (CJ-01) and the effect of hot-water extract from its fruit bodies. *International Seminar on Development of Agribusiness and its Impact on Agricultural Production in Southeast Asia*. (dados completos não foram encontrados).
- EGUCHI, F.; YOSHIMOTO, H.; YOSHIMOTO, T. & HIGAKI, M. - Physiological factors affecting mycelial growth of *Agaricus blazei*. *Mokuzai Gakkaishi*, 40 (6): 666-671. 1994.
- FISCHER, M. - Molecular and microscopical studies in the *Phellinus pini* group. *Mycologia*, 88 (2): 230-238. 1996a.
- FISCHER, M. - On the species complexes within *Phellinus: Fomitiporia* revisited. *Mycol Res*, 100 (12): 1459-1467. 1996b.
- FREEMAN, A.E.H. - *Agaricus* in the Southern United States. *Mycotaxon*, 8: 50-118. 1979.
- GRIFFIN, D. - *Fungal Physiology*. 2.ed. New York. Wiley-Liss. 1994. 458p.
- GUILLÉN, F.; MUÑOZ, C.; GÓMEZ-TORIBIO, V.; MARTÍNEZ, A.T. & MARTÍNEZ, M.J. - Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl Environ Microbiol*, 66 (1): 170-175. 2000.
- GUZMÁN, G.; MONTOYA, L.; MATA, G. & SALMONES, D. - Studies in the genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. ostreatus*-complex based in interbreeding strains and in the study of basidiomata obtained in culture. *Mycotaxon*, 50: 365-378. 1994.
- HARKIN, J.M. & OBST, J.R. - Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, 29 (4): 381-387. 1973.
- HARVEY, C.L.; WUEST, P.J. & SCHISLER, L.C. - Diseases, weed molds, indicator molds, and abnormalities of the commercial mushroom. In: WUEST, P.J., ed. - *Penn State Handbook for commercial mushroom growers*. Pennsylvania, Penn State, 1982. p.19-33.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C. & PEGLER, D.N. - *Dictionary of the Fungi*. 8.ed. Cambridge. Univ. Press. 1995. 616p.
- HEINEMAN, P. - Agarici austroamericani VIII: Agaricaceae des regions intertropicales d'Amérique du Sud. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.*, 62: 355-384. 1993.
- HENRION, B.; CHEVALIER, G. & MARTIN, F. - Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol Res*, 98: 37-43. 1994.
- HINTZ, W.E.A.; ANDERSON, J.B. & HORGAN, P.A. - Relatedness of three species of *Agaricus* inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of the ribosomal DNA repeat and mitochondrial DNA. *Genome*, 32 (2): 173-178. 1989.



- HOLMGREN, P.K.; HOLMGREN, N.H. & BARNETT, L.C. - Index Herbariorum, Part. I. *The Herbaria of the World. International Association for Plant Taxonomy*. 8.ed. New York. New York Botanical Garden. 1990. 693p.
- HORNA, S.L. & ROYSE, D.J. - Selection of lines of *Agaricus brunnescens* Peck for higher production temperatures. *Hort Science*, **18** (6): 866-868. 1983.
- HUANG, R.C.; HUNG, M.L. & WANG, B.C. - Phylogenetic study and grouping of commercial shiitake in Taiwan. *J Chinese Agric Chem Soc*, **37** (3): 431-441. 1999.
- IRAÇABAL, B. & LABARÈRE, J. - Restriction site and length polymorphism of the rDNA unit in the cultivated basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Theor. Appl. Genet.*, **88**: 824-830. 1994.
- IRAÇABAL, B.; ROUX, P. & LABARÈRE, J. - Study of enzyme polymorphism in *Agaricus* and *Pleurotus* species for characterization and genetic improvement. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, 1991. Proceeding of the congress. Ed. MAHER, M.J.
- IRAÇABAL, B.; ZERVAKIS, G. & LABARÈRE, J. - Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology*, **141**: 1479-1490. 1995.
- IWADE, I. & MIZUNO, T. - V. Cultivation of Kawariharatake (*Agaricus blazei* Murill). *Food Ver, Int.*, **13** (3): 383-390. 1997.
- JACOBS, K.A. & REHNER, S.A. - Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia*, **90** (4): 601-610. 1998.
- JODON, M.H.; ROYSE, D.J. & JONG, S.C. - Productivity of *Agaricus brunnescens* stock cultures following 5-, 7-, and 10-year storage periods in liquid nitrogen. *Criobiology*, **19**: 602-606. 1982.
- JUNGHANS, D.T.; GOMES, E.A.; GUIMARÃES, W.V.; BARROS, E.G. & ARAÚJO, E.F. - Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. *Mycorrhiza*, **7**: 243-248. 1998.
- KÄÄRIK, A. - The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Studia Forestalia Suecia*, **31**: 1-81. 1965.
- KALBERER, P.P. - Influence of the water potential of the casing soil on crop yield and on dry-matter content, osmotic potential and mannitol content of the fruit bodies of *Agaricus bisporus*. *J Hort Sci*, **65** (5): 573-581. 1990.
- KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; YUMEN, T.; MIZUNO, T.; HAGIWARA, T. & NAKAMURA, T. - Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydr Res*, **183**: 150-154. 1988.
- KERRIGAN, R.W.; CALLAC, P.; XU, J. & NOBLE, R. - Population and phylogenetic structure within the *Agaricus subfloccosus* complex. *Mycol Res*, **103** (2): 1515-1523. 1999.
- KHUSH, R.S.; BECKER, E. & WACH, M. - DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*, **58** (9): 2971-2977. 1992.
- KLÁN, J. & BAUDISOVÁ, D. - Cultural, enzyme and genetic studies in the genus *Flammulina* Karst. *Mycotaxon*, **43**: 341-350. 1992.
- KRETZER, A.; LI, Y.; SZARO, T. & BRUNS, A.D. - Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: Phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia*, **88** (5): 776-785. 1996.
- KUWARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A. & GOLD, M.H. - Separation and characterization of the extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, **169**: 247-250. 1984.
- LI, A.; BEGIN, M.; KOKUREWICZ, K.; BOWDEN, C. & HORGEN, P.A. - Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*, **60** (7): 2384-2388. 1994.
- LOFTUS, M.G.; MOORE, D. & ELLIOTT, T.J. - DNA polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Theoret Appl Genet*, **76** (5): 712-718. 1988.
- LONERGAN, G.; JONES, C. & MAINWARING, D. - The effect of pH and temperature on radial growth rate and biomass production for selected Australian white-rot fungi in comparison with two strains of *Phanerochaete chrysosporium*. *Material Organisms*: 309-317. 1994.
- MACAULEY, B.J. & BETHEL, M. - Ergosterol as an indicator of biomass of *Agaricus brunnescens* mycelium grown under varying cultural conditions. *Fourth International Mycological Congress*. Regensburg, Germany. 1990. Abstracts: 331.

- MALLOCH, D.; CASTLE, A. & HINTZ, W. - Further evidence for *Agaricus brunnescens* Peck as the preferred name for the cultivated *Agaricus*. *Mycologia*, **79** (6): 839-846. 1987.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R. & ROCHE, C. - Measurements of saccharifying cellulase. *J Bact*, **73**: 269-278. 1976.
- MARTIN, F.; DE LARUELLE, C. & HILBERT, J. - An improved assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizae. *Mycol Res*, **94**: 1059-1064. 1990.
- MATA, G. & SAVOIE, J.M. - Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J Microbiol Biotechnol*, **14**: 513-519. 1998.
- MATA, G.; SAVOIE, J.M. & DELPECH, P. - Variability in laccase production by mycelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in the presence of soluble lignin derivatives in solid media. *Material Organisms*, **31** (2): 109-122. 1997.
- MATA, G.; SALMONES, D.; PÉREZ, R. & GUZMÁN, G. - Behavior of some strains of the genus *Pleurotus* after different procedures fro freezing in liquid nitrogen. *Rev Microbiol*, **25** (3): 197-200. 1994.
- MATSUMOTO, T.; MIMURA, K. & FUKUMASA-NAKAI, Y. - Isozyme variation and genetic relatedness among natural populations of *Pleurotus ostreatus*. *J Gen Appl Microbiol*, **41**: 487-497. 1995.
- MATSUMOTO, T. & FUKUMASA-NAKAI, Y. - Mitochondrial DNA polymorphism and inheritance in *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Rept Tottori Mycol Inst*, **31**: 153-161. 1993.
- MATSUMOTO, T. & FUKUMASA-NAKAI, Y. - Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms and phenetic relationships in natural populations of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Mycol Res*, **99** (5): 562-566. 1995.
- MAU, J.H.; BEELMAN, R.B. & ZIEGLER, G.R. - Effect of 10-oxo-trans-8-decenoic acid on growth of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, **31** (12): 4059-4064. 1992.
- MILES, P.G. & CHANG, S.T. - Mushroom Biology: Concise baics and current developments. Singapore. *World Scientific*. 1997. 194p.
- MILLER, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, **31**: 426-428. 1959.
- MIZUNO, M.; MINATO, K.; KAWADE, M.; TERAJ, H. & TSUCHIDA, H. - Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *Biochem Mol Biol Int*, **47** (4): 707-714. 1999.
- MIZUNO, T. - Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: Medicinal and dietary effects. *Food Ver Int*, **11** (1): 167-172. 1995.
- MIZUNO, T. - The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). *Int J Med Mush*, **1** (1): 9-29. 1999.
- MOORE-LANDECKER, E. - *Fundamentals of the fungi*. 4.ed. Engleworth Cliffs.Prentice Hall. 1992. 574p.
- MOSER, M. - *Keys to agarics and boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales)*. Ed. G. Kibby. London. 1983. 535p.
- MUNSELL, L. - *Munsell Soil Color Charts*. U. S. Dep. Agric. Hand 18 - Soil Survey Manual. 1975.
- MURRILL, W.A. - New Florida fungi. *Quart J Florida Acad Sci*, **8**: 175-198. 1945.
- NEALE, D.B.; DEVEY, M.E.; JERMSTAD, K.D.; AHUDA, M.R.; ALOSI, M.C.; MARSHALL, K.A. - Use of DNA markers in forest tree improvement research. *New For*, **5**:1-17. 1992.
- NEI, M. & LI, W.H. - Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci*, **76**: 5269-5273. 1979.
- NEWELL, S.Y. - Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In: CARROLL, G.C. & WICKLOW, D.T., ed. - *The Fungal Community*. 2.ed. New York, Marcel Dekker Inc., 1992. p.521-561.
- NOBLE, R.; GROGAN, H.M. & ELLIOTT, T. - Variation in morphology, growth and fructification of isolates in the *Agaricus subfloccosus* complex. *Mycol Res*, **99** (12): 1453-1461. 1995.
- NOBLES, M.K. - Studies in forest pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can J Res*, **26**: 281-431. 1948.
- NOBLES, M.K. - Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the Polyporaceae. *Can J Bot*, **36**: 883-920. 1958.

- NOBLES, M.K. - Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can J Bot*, **43**: 1097-1139. 1965.
- ODUM, E.P. - *Ecologia*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara. 1988. 434p.
- OHGA, S.; SMITH, M.; THURSTON, C.F.; WOOD, D.A. - Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes in the mycelium of *Agaricus bisporus* during fruit body development on a solid substrate. *Mycol Res*, **103** (12): 1557-1560. 1999.
- OKEKE, B.C.; PATERSON, A.; SMITH, J.E. & WATSON-CRAIK, I.A. - Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **48**(4): 563-569. 1997.
- ORTH, A.B.; ROYSE, D.J. & TIEN, M. - Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl Environ Microbiol*, **59** (12): 4017-4023. 1993
- OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J. & MIYAZAKI, T. - Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*. *J Pharm Soc Japan*, **114** (5): 342-350. 1994.
- PASANEN, A-L.; PIETILÄ, K.Y.; PASANEN, P; KALLIOKOSKI, P. & TARHANEN, J. - Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Appl Environ Microbiol*, **65** (1): 138-142. 1999.
- PROSSER, J.I. & TOUGH, A.J. - Growth mechanisms and growth kinetics in filamentous microorganisms. *Biotechnology*, **10**: 253-274. 1991.
- PRZYBYLOWICZ, P. & DONOGHUE, J. - *Shiitake growers handbook: The art and science of mushroom cultivation*. United States. Kendall/Hunt Publishing Company. 1990. 217p.
- RATCLIFFE, B.; FLURKEY, W.H.; KUGLIN, J. & DAWLEY, R. - Tyrosinase, laccase, and peroxidase in mushrooms (*Agaricus*, Crimini, Oyster, and Shiitake). *J Food Sci*, **59** (4): 824-827. 1994.
- REDDY, M.S. & PATRICK, Z.A. - Effect of bacteria associated with mushroom compost and casing materials on basidiomata formation in *Agaricus bisporus*. *Can J Plant Path*, **12**: 236-242. 1990.
- REESLEV, M. & KJØLLER, A. - Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Appl Environ Microbiol*, **61** (12): 4236-4239. 1995.
- REYES, R.G.; EGUCHI, F.; IJIMA, T. & HIGAKI, M. - Physiological considerations for efficient mycelial colonization of Philippine strains of *Volvariella volvacea*. *J Wood Sci*, **44**: 408-413. 1998.
- RINKER, D. *Commercial mushroom production*. Ontario. Horticultural Research Institute of Ontario: Publication 350. 1993. 41p.
- ROUX, P. & LABARÈRE, J. - Isozyme characterization of dikaryotic strains of the edible Basidiomycete *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*). *Exp Mycol*, **14** (2): 101-112. 1990.
- ROYSE, D.J. - Recycling of spent shiitake substrate for production of the oyster mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **38**: 179-182. 1992.
- RYVARDEN, L. - *Genera of Polypores – Nomenclature and Taxonomy*. Fungiflora, Oslo. 354p.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, J.E. - Research update on growing Portobello and *A. blazei* on noncomposted substrates. Lecture. *IX Annual Specialty Mushroom Workshop*. Penn State University, State College, PA. 1999.
- SARIKAYA, A. & LADISCH, M.R. - Solid-state fermentation of lignocellulosic plant residues from *Brassica napus* by *Pleurotus ostreatus*. *Appl Biochem Biotechnol*, **82**: 1-15. 1999.
- SCHÄFER, C.; WÖSTMAYER, J. & RANDOM. - Primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *J. Phytopathology*, **136**: 124-136. 1992.
- SCHOEMAKER, H.E. & PIONTEK, K. - On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure & Appl. Chem.* **68** (11): 2089-2096. 1996.
- SEMEDO, L.T.; GOMES, R.C.; BOM, E.P.; SOARES, R.M., LINHARES, L.F. & COELHO, R.R. – Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil. *Appl Biochem Biotechnol*, **84-86**: 267-276. 2000.
- SINGER, R. - *The Agaricales in Modern Taxonomy*. 3.ed. J. Vaduz. Cramer. 1975. 912p.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A.E. - Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, **81**: 234-240. 1989.

- SOKAL, R.R. & MICHENER, C.D. - A statistical method for evaluating systematic relationships. *Kansas Univ Sci Bull*, **38**: 1409-1438. 1958.
- STALPERS, J.A. - Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. *Studies Mycol*, **16**: 1-248. 1978.
- STAMETS, P. - *The Mushroom Cultivator*. Washington. Agrikon Press. 1983. 415p.
- STOOP, J.M.H. & MOOIBROEK, H. - Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **52**: 474-483. 1999.
- STRAATSMA, G.; SAMSON, R.A.; OLIJNSMA, T.W.; CAMP, H.J.M.O.; GERRITS, J.P.G. & GRIENSVEN, L.J.L.D. - Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Appl Environ Microbiol*, **60** (2): 454-458. 1994.
- TAN, Y.H. & MOORE, D. - Conventional and effective methods for *in vitro* cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinula edodes*. *Mycol Res*, **96** (12): 1077-1084. 1992.
- TAN, Y.H. & WAHAB, M.N. - Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *World J Microbiol Biotechnol*, **13** (6): 613-617. 1997.
- TANESAKA, E.; MASUDA, H. & KINUGAWA, K. - Wood degrading ability of Basidiomycetes that are wood decomposers, litter decomposers, or mycorrhizal symbionts. *Mycologia*, **85** (3): 347-354. 1993.
- TAYLOR, J.B. - Biochemical tests for identification of mycelial cultures of basidiomycetes. *Ann Appl Biol*, **78**: 113-123. 1974.
- TIEN, N. & KIRK, T.K. - Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**: 2280-2284. 1984.
- TURNER, E.M. - Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Trans Br Mycol Soc*, **63**: 541-547. 1974.
- VYAS, B.R.M., VOLC, J. & SASEK, V. - Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiol*, **39** (3): 235-240. 1994.
- WASSER, S.P. & WEIS, A.L. - Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *Int J Med Mush*, **1** (1): 31-62. 1999.
- WENZEL, I.M. & DIAS, E.S. - Estudos fisiológicos e citogenéticos sobre o *Agaricus blazei*. *XX Congresso Brasileiro de Microbiologia*. Salvador. 1999. Livro de resumos: 277.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. - 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAUD, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds.) PCR protocols. *A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, 315-322.
- WIEGANT, W.M.; WERY, J.; BUITENHUIS, E.T. & BONT, J.A.M. - Growth-promoting effect of thermophilic fungi on the mycelium of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*, **58** (8): 2654-2659. 1992.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., *et al.* - DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, **18**: 6531-6535. 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. - Genetics analysis using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Methods Enzymol.*, **218**: 704-742. 1993.
- WOOD, D.A. - Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol*, **117**: 327-338. 1980.
- XU, J.; KERRIGAN, R.W.; CALLAC, P.; HORGAN, P.A. & ANDERSON, J.B. - Genetic structure of natural populations of *Agaricus bisporus*, the commercial button mushroom. *J Hered*, **88** (6): 482-488. 1997.
- YONEYAMA, M.; MEGURO, S. & KAWACHI, S. - Liquid culture of *Agaricus blazei*. *Mokuzai Gakkaishi*, **43** (4): 349-355. 1997a.
- YONEYAMA, M.; MEGURO, S. & KAWACHI, S. - Liquid culture of *Agaricus blazei* II. Affinity for dissolved oxygen. *Mokuzai Gakkaishi*, **43** (11): 948-955. 1997b.
- YOUN, H-D.; HAH, Y.C. & KANG, S-O. - Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, **132**: 183-188. 1995.

ZERVAKIS, G. & LABARÈRE, J. - Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *J Gen Microbiol*, **138**: 635-645. 1992.

ZHANG, Y. & MOLINA, F. - Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. *FEMS Microbiology Letters*, **131** (1): 17-20. 1995.

## ANEXO 1

GENERAL MANOVA			Teste de Scheffé Interação Estirpes e Meios					
ESTIRPES	MEIOS	TEMP	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
			4.538791	4.503750	2.601875	3.612500	4.251875	4.799275
21	AEM			.983370	0.000000	.000000	.190688	.955865
21	ABD		.983370		0.000000	.000000	.955765	.179768
22	AEM		0.000000	0.000000		.000000	0.000000	0.000000
22	ABD		.000000	.000000	.000000		.000000	.000000
23	AEM		.190688	.955765	0.000000	.000000		.000663
23	ABD		.955865	.179768	0.000000	.000000	.000663	
24	AEM		.719756	.999907	0.000000	.000000	.999958	.023671
24	ABD		.000000	.000000	.000000	.999925	.000000	.000000
33	AEM		.022903	.000026	0.000000	0.000000	.000000	.805288
33	ABD		1.000000	.994511	0.000000	.000000	.295121	.927184
34	AEM		.999947	.686657	0.000000	.000000	.015656	.999776
34	ABD		.985387	1.000000	0.000000	.000000	.960816	.200141

GENERAL MANOVA			Teste de Scheffé Interação Estirpes e Meios					
ESTIRPES	MEIOS	TEMP	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
			4.424792	3.688125	4.994875	4.625208	4.713125	4.503750
21	AEM		.719756	.000000	.022903	1.000000	.999947	.985387
21	ABD		.999907	.000000	.000026	.994511	.686657	1.000000
22	AEM		0.000000	.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
22	ABD		.000000	.999925	0.000000	.000000	.000000	.000000
23	AEM		.999958	.000000	.000000	.295121	.015656	.960816
23	ABD		.023671	.000000	.805288	.927184	.999776	.200141
24	AEM		.000000	.000000	.000001	.823679	.213572	.999920
24	ABD		.000000		0.000000	.000000	.000000	.000000
33	AEM		.000001	0.000000		.017042	.188272	.000041
33	ABD		.823679	.000000	.017042		.999729	.995201
34	AEM		.213572	.000000	.188272	.999729		.710165
34	ABD		.999920	.000000	.000041	.995201	.710165	

## ANEXO 2

GENERAL MANOVA			Teste de Scheffé para Biomassa Estirpes X Meios					
ESTIRPES	MEIOS	TEMP	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
			2011640	2547000	1166396	0708812	1381888	2977125
21	AEM	(1)		877514	202107	.000493	.658024	.092732
21	ABD	(2)	.877514		.000147	.000000	.003646	.974409
22	AEM	(3)	.202107	.000147		.953199	.999948	.000000
22	ABD	(4)	.000493	.000000	.953199		.544519	.000000
23	AEM	(5)	.658024	.003646	.999948	.544519		.000004
23	ABD	(6)	.092732	.974409	.000000	.000000	.000004	
24	AEM	(7)	.974646	.075422	.982271	.172471	.999977	.000386
24	ABD	(8)	.991612	.999997	.002079	.000000	.031950	.789894
33	AEM	(9)	.769227	1.000000	.000048	.000000	.001399	.992761
33	ABD	(10)	.897469	1.000000	.000311	.000000	.006279	.981188
34	AEM	(11)	.061737	.961834	.000000	.000000	.000001	1.000000
34	ABD	(12)	.629849	1.000000	.000020	.000000	.000609	.999101

GENERAL MANOVA			Teste de Scheffé para Biomassa Estirpes X Meios					
ESTIRPES	MEIOS	TEMP	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
			1583396	2388125	2608312	2549654	2984875	2679708
21	AEM	(1)	.974646	.991612	.769227	.897469	.061737	.629849
21	ABD	(2)	.075422	.999997	1.000000	1.000000	.961834	1.000000
22	AEM	(3)	.982271	.002079	.000048	.000311	.000000	.000020
22	ABD	(4)	.172471	.000000	.000000	.000000	.000000	.000000
23	AEM	(5)	.999977	.031950	.001399	.006279	.000001	.000609
23	ABD	(6)	.000386	.789894	.992761	.981188	1.000000	.999101
24	AEM	(7)		.293655	.038880	.099410	.000159	.020251
24	ABD	(8)	.293655		.999923	.999998	.730846	.998978
33	AEM	(9)	.038880	.999923		1.000000	.988441	1.000000
33	ABD	(10)	.099410	.999998	1.000000		.972059	1.000000
34	AEM	(11)	.000159	.730846	.988441	.972059		.998437
34	ABD	(12)	.020251	.998978	1.000000	1.000000	.998437	



### ANEXO 3

Continue...				Teste de Scheffé Interação Estirpes e Temperatura				
ESTIRPES MEIOS	TEMP	DIAS	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
			2.923750	4.810833	5.383750	5.158750	2.472500	
21	20	(1)		0.000000	0.000000	0.000000	682011	
21	25	(2)	0.000000		209125	975391	0.000000	
21	28	(3)	0.000000	209125		999987	0.000000	
21	30	(4)	0.000000	975391	999987		0.000000	
22	20	(5)	682011	0.000000	0.000000	0.000000		
22	25	(6)	999944	0.000000	0.000000	0.000000	011679	
22	28	(7)	001230	0.000000	0.000000	0.000000	000000	
22	30	(8)	999998	0.000000	0.000000	0.000000	030113	
23	20	(9)	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000	988327	
23	25	(10)	0.000000	989915	0.00011	013270	0.000000	
23	28	(11)	0.000000	0.00268	999007	521596	0.000000	
23	30	(12)	0.000000	262448	1.000000	999997	0.000000	
24	20	(13)	147293	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000	
24	25	(14)	0.000000	128430	0.000000	0.000001	0.000000	
24	28	(15)	0.000000	1.000000	919453	1.000000	0.000000	
24	30	(16)	0.000000	1.000000	011679	596248	0.000000	
33	20	(17)	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000	902826	
33	25	(18)	0.000000	975107	999998	1.000000	0.000000	
33	28	(19)	0.000000	0.000000	337198	003116	0.000000	
33	30	(20)	0.000000	689614	1.000000	1.000000	0.000000	
34	20	(21)	999992	0.000000	0.000000	0.000000	021979	
34	25	(22)	0.000000	999672	998106	1.000000	0.000000	
34	28	(23)	0.000000	695256	1.000000	1.000000	0.000000	
34	30	(24)	0.000000	1.000000	716738	999958	0.000000	
Continue...				Teste de Scheffé Interação Estirpes e Temperatura				
ESTIRPES MEIOS	TEMP	DIAS	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	
			3.155250	3.632000	3.120000	2.738750	4.465833	
21	20	(1)	999944	001230	999998	1.000000	000000	
21	25	(2)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	989915	
21	28	(3)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.00011	
21	30	(4)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	013270	
22	20	(5)	011679	0.000000	030113	988327	0.000000	
22	25	(6)		317451	1.000000	963290	0.000000	
22	28	(7)	317451		181338	0.00013	001271	
22	30	(8)	1.000000	181338		990519	0.000000	
23	20	(9)	963290	0.00013	990519		0.000000	
23	25	(10)	0.000000	001271	0.000000	0.000000		
23	28	(11)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	
23	30	(12)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.00020	
24	20	(13)	0.00238	0.000000	0.00834	693753	0.000000	
24	25	(14)	0.000000	486418	0.000000	0.000000	999655	
24	28	(15)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	504512	
24	30	(16)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	999966	
33	20	(17)	997528	0.00155	999700	1.000000	0.000000	
33	25	(18)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	017468	
33	28	(19)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	
33	30	(20)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.00538	
34	20	(21)	1.000000	223060	1.000000	984265	0.000000	
34	25	(22)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	130334	
34	28	(23)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.00561	
34	30	(24)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	649153	

(Cont.)

ANEXO 3 (Cont.)

Continue...			Teste de Scheffé Interação Estirpes e Temperatura				
ESTIRPES MEIOS	TEMP	DIAS	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
21	20	(1)	0.000000	0.000000	147293	000000	000000
21	25	(2)	000268	262448	0.000000	128430	1.000000
21	28	(3)	999007	1.000000	0.000000	000000	919453
21	30	(4)	521596	999997	0.000000	000001	1.000000
22	20	(5)	0.000000	0.000000	1.000000	000000	0.000000
22	25	(6)	0.000000	0.000000	000238	000000	000000
22	28	(7)	000000	000000	000000	486418	000000
22	30	(8)	0.000000	0.000000	000834	000000	000000
23	20	(9)	0.000000	0.000000	693753	000000	0.000000
23	25	(10)	000000	000020	000000	999655	504512
23	28	(11)		997802	0.000000	000000	037202
23	30	(12)	997802		0.000000	000000	946529
24	20	(13)	0.000000	0.000000		000000	0.000000
24	25	(14)	000000	000000	000000		001874
24	28	(15)	037202	946529	0.000000	001874	
24	30	(16)	000002	017501	0.000000	472596	998960
33	20	(17)	0.000000	0.000000	371779	000000	000000
33	25	(18)	655449	999999	0.000000	000002	999999
33	28	(19)	999917	275292	0.000000	000000	000017
33	30	(20)	928587	1.000000	0.000000	000000	998724
34	20	(21)	0.000000	0.000000	000546	000000	000000
34	25	(22)	238464	999157	0.000000	000073	1.000000
34	28	(23)	926173	1.000000	0.000000	000000	998807
34	30	(24)	006500	780982	0.000000	003525	1.000000

Continue...			Teste de Scheffé Interação Estirpes e Temperatura				
ESTIRPES MEIOS	TEMP	DIAS	(15)	(17)	(18)	(19)	(20)
21	20	(1)	000000	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000
21	25	(2)	1.000000	000000	975107	000000	689614
21	28	(3)	011679	0.000000	999998	337198	1.000000
21	30	(4)	596248	0.000000	1.000000	003116	1.000000
22	20	(5)	0.000000	902826	0.000000	0.000000	0.000000
22	25	(6)	000000	997528	000000	0.000000	0.000000
22	28	(7)	000000	900155	000000	0.000000	000000
22	30	(8)	000000	999700	000000	0.000000	0.000000
23	20	(9)	000000	1.000000	0.000000	0.000000	0.000000
23	25	(10)	999966	000000	017468	000000	000538
23	28	(11)	000002	0.000000	655449	999917	928587
23	30	(12)	017501	0.000000	999999	275292	1.000000
24	20	(13)	0.000000	371779	0.000000	0.000000	0.000000
24	25	(14)	472596	000000	000002	000000	000000
24	28	(15)	998960	000000	999999	000017	998724
24	30	(16)		000000	617389	000000	140687
33	20	(17)	000000		0.000000	0.000000	0.000000
33	25	(18)	617389	0.000000		008637	1.000000
33	28	(19)	000000	0.000000	008637		051216
33	30	(20)	140687	0.000000	1.000000	051216	
34	20	(21)	000000	999342	000000	0.000000	0.000000
34	25	(22)	940505	0.000000	1.000000	000536	999999
34	28	(23)	149963	0.000000	1.000000	049822	1.000000
34	30	(24)	999902	000000	999943	000001	982677

(Cont.)



ANEXO 3 (Cont.)

Continue...			Teste de Scheffé Interação Estirpes e Temperatura			
ESTIRPES MEIOS	TEMP	DIAS	{21} 3.132500	{22} 5.086250	{23} 5.275000	{24} 4.940000
21	20	{1}	.999992	.000000	0.000000	.000000
21	25	{2}	.000000	.999672	.695256	1.000000
21	28	{3}	0.000000	.998106	1.000000	.716738
21	30	{4}	.000000	1.000000	1.000000	.999958
22	20	{5}	.021979	0.000000	0.000000	0.000000
22	25	{6}	1.000000	.000000	0.000000	.000000
22	28	{7}	.223060	.000000	.000000	.000000
22	30	{8}	1.000000	.000000	0.000000	.000000
23	20	{9}	.984265	0.000000	0.000000	0.000000
23	25	{10}	.000000	.130334	.000561	.649153
23	28	{11}	0.000000	.238464	.926173	.006500
23	30	{12}	0.000000	.999157	1.000000	.780982
24	20	{13}	.000546	0.000000	0.000000	0.000000
24	25	{14}	.000000	.000073	.000000	.003525
24	28	{15}	.000000	1.000000	.998807	1.000000
24	30	{16}	.000000	.940505	.143963	.999902
33	20	{17}	.999342	0.000000	0.000000	.000000
33	25	{18}	.000000	1.000000	1.000000	.999943
33	28	{19}	0.000000	.000536	.049822	.000001
33	30	{20}	0.000000	.999999	1.000000	.982677
34	20	{21}	.000000	.000000	0.000000	.000000
34	25	{22}	.000000	.000000	.999999	1.000000
34	28	{23}	0.000000	.999999	.000000	.983487
34	30	{24}	.000000	1.000000	.983487	.000000

ANEXO 4

GENERAL MANOVA			Probabilities for Post Hoc Tests Estirpes X Temperatura					
ESTIRPES MEIOS	TEMP		(1) 1163000	(2) 2073792	(3) 2824875	(4) 2271612	(5) 0790292	(6) 1092375
21	20	(1)		181771	172322	.933682	1.000000	1.000000
21	25	(2)	.181771		1.000000	.999997	018996	.119184
21	28	(3)	.172322	1.000000		.999999	016319	.110473
21	30	(4)	.933682	.999997	.999999		.489202	.877051
22	20	(5)	1.000000	018996	016319	.489202		1.000000
22	25	(6)	1.000000	.119184	.110473	.877051	1.000000	
22	28	(7)	1.000000	.153197	.143927	.912834	1.000000	1.000000
22	30	(8)	1.000000	007559	006011	.346588	1.000000	1.000000
23	20	(9)	1.000000	.365722	.359019	.987231	1.000000	1.000000
23	25	(10)	.970723	.999995	.999998	1.000000	.633463	.939133
23	28	(11)	.033940	1.000000	1.000000	.998827	001961	.018918
23	30	(12)	.995334	.999409	.999625	1.000000	.812019	.986741
24	20	(13)	1.000000	.062345	.055772	.761867	1.000000	1.000000
24	25	(14)	.358247	1.000000	1.000000	1.000000	.055147	.259138
24	28	(15)	.758618	1.000000	1.000000	1.000000	.250625	.652668
24	30	(16)	.999999	.933054	.939223	.999999	.994108	.999986
33	20	(17)	1.000000	.679541	.683205	.999540	.999928	1.000000
33	25	(18)	.095107	1.000000	1.000000	.999944	.007585	.058018
33	28	(19)	.259352	1.000000	1.000000	1.000000	.032602	.178343
33	30	(20)	.040360	1.000000	1.000000	.999649	.002252	.022335
34	20	(21)	.999998	.933901	.940040	.999999	.993986	.999986
34	25	(22)	.001076	.999998	.999984	.883931	.000033	.000493
34	28	(23)	.027279	1.000000	1.000000	.999062	.001370	.014634
34	30	(24)	.038491	1.000000	1.000000	.999601	.002119	.021217

GENERAL MANOVA			Probabilities for Post Hoc Tests Estirpes X Temperatura					
ESTIRPES MEIOS	TEMP		(7) 2133375	(8) 0744375	(9) 1795075	(10) 2239750	(11) 3119875	(12) 2061125
21	20	(1)	1.000000	1.000000	1.000000	.970723	.033940	.995334
21	25	(2)	.153197	.007559	.365722	.999995	1.000000	.999409
21	28	(3)	.143927	.006011	.359019	.999998	1.000000	.999625
21	30	(4)	.912834	.346588	.987231	1.000000	.998827	1.000000
22	20	(5)	1.000000	1.000000	1.000000	.633463	.001961	.812019
22	25	(6)	1.000000	1.000000	1.000000	.939133	.018918	.986741
22	28	(7)		1.000000	1.000000	.959583	.026701	.992615
22	30	(8)	1.000000		.999999	.497434	.000596	.698711
23	20	(9)	1.000000	.999999		.995651	.096328	.999687
23	25	(10)	.959583	.497434	.995651		.998523	1.000000
23	28	(11)	.026701	.000596	.096328	.998523		.973578
23	30	(12)	.992615	.698711	.999687	1.000000	.973578	
24	20	(13)	1.000000	1.000000	1.000000	.864175	.008028	.957758
24	25	(14)	.314685	.025578	.590745	1.000000	1.000000	.999976
24	28	(15)	.716032	.153160	.912069	1.000000	.999996	1.000000
24	30	(16)	.999996	.984403	1.000000	1.000000	.649205	1.000000
33	20	(17)	1.000000	.999697	1.000000	.999898	.288498	.999999
33	25	(18)	.077745	.002687	.222579	.999915	1.000000	.996111
33	28	(19)	.223018	.013980	.473286	.999999	1.000000	.999861
33	30	(20)	.031670	.000647	.114865	.999529	1.000000	.986308
34	20	(21)	.999996	.984117	1.000000	1.000000	.651404	1.000000
34	25	(22)	.000779	.000007	.004687	.882984	1.000000	.601967
34	28	(23)	.021125	.000372	.083027	.998814	1.000000	.974921
34	30	(24)	.030153	.000604	.110473	.999469	1.000000	.985184

(Cont.)



**ANEXO 4 (Cont.)**

GENERAL MANOVA			Probabilities for Post Hoc Tests Estirpes X Temperatura					
ESTIRPES MEIOS	TEMP		{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}
			0996875	2736083	2484833	1725250	1498375	2879167
21	20	{1}	1.000000	358247	.758618	.999999	1.000000	.095107
21	25	{2}	.062345	1.000000	1.000000	.933054	.679541	1.000000
21	28	{3}	.055772	1.000000	1.000000	.939223	.683205	1.000000
21	30	{4}	.761867	1.000000	1.000000	.999999	.999540	.999944
22	20	{5}	1.000000	.055147	.250625	.994108	.999928	.007585
22	25	{6}	1.000000	.259138	.652668	.999986	1.000000	.058018
22	28	{7}	1.000000	.314685	.716032	.999996	1.000000	.077745
22	30	{8}	1.000000	.025578	.153160	.984403	.999697	.002687
23	20	{9}	1.000000	.590745	.912069	1.000000	1.000000	.222579
23	25	{10}	.864175	1.000000	1.000000	1.000000	.999898	.999915
23	28	{11}	.008028	1.000000	.999996	.649205	.288498	1.000000
23	30	{12}	.957758	.999976	1.000000	1.000000	.999999	.996111
24	20	{13}		.154296	.494797	.999831	1.000000	.027640
24	25	{14}	.154296		1.000000	.985271	.860297	1.000000
24	28	{15}	.494797	1.000000		.999808	.989338	1.000000
24	30	{16}	.999831	.985271	.999808		1.000000	.843146
33	20	{17}	1.000000	.860297	.989338	1.000000		.506746
33	25	{18}	.027640	1.000000	1.000000	.843146	.506746	
33	28	{19}	.099296	1.000000	1.000000	.965977	.777179	1.000000
33	30	{20}	.009332	1.000000	1.000000	.713924	.336407	1.000000
34	20	{21}	.999826	.985530	.999814	1.000000	1.000000	.844648
34	25	{22}	.000163	.999915	.991730	.136549	.026719	1.000000
34	28	{23}	.005878	1.000000	.999998	.637489	.268146	1.000000
34	30	{24}	.008821	1.000000	.999999	.704794	.327515	1.000000

GENERAL MANOVA			Probabilities for Post Hoc Tests Estirpes X Temperatura					
ESTIRPES MEIOS	TEMP		{19}	{20}	{21}	{22}	{23}	{24}
			2806542	3032250	1726625	3484792	3079625	3038125
21	20	{1}	.259352	.040360	.999998	.001076	.027279	.038491
21	25	{2}	1.000000	1.000000	.933901	.999998	1.000000	1.000000
21	28	{3}	1.000000	1.000000	.940040	.999984	1.000000	1.000000
21	30	{4}	1.000000	.999649	.999999	.883931	.999062	.999601
22	20	{5}	.032602	.002252	.993986	.000033	.001370	.002119
22	25	{6}	.178343	.022335	.999986	.000493	.014634	.021217
22	28	{7}	.223018	.031670	.999996	.000779	.021125	.030153
22	30	{8}	.013980	.000647	.984117	.000007	.000372	.000604
23	20	{9}	.473286	.114865	1.000000	.004687	.083027	.110473
23	25	{10}	.999999	.999529	1.000000	.882984	.998814	.999469
23	28	{11}	1.000000	1.000000	.651404	1.000000	1.000000	1.000000
23	30	{12}	.999861	.986308	1.000000	.601967	.974921	.985184
24	20	{13}	.099296	.009332	.999826	.000163	.005878	.008821
24	25	{14}	1.000000	1.000000	.985530	.999915	1.000000	1.000000
24	28	{15}	1.000000	1.000000	.999814	.991730	.999998	.999999
24	30	{16}	.965977	.713924	1.000000	.136549	.637489	.704794
33	20	{17}	.777179	.336407	1.000000	.026719	.268146	.327515
33	25	{18}	1.000000	1.000000	.844648	1.000000	1.000000	1.000000
33	28	{19}		1.000000	.966484	.999986	1.000000	1.000000
33	30	{20}	1.000000		.716044	1.000000	1.000000	1.000000
34	20	{21}	.966484	.716044		.137700	.639785	.706941
34	25	{22}	.999986	1.000000	.137700		1.000000	1.000000
34	28	{23}	1.000000	1.000000	.639785	1.000000		1.000000
34	30	{24}	1.000000	1.000000	.706941	1.000000	1.000000	

## ANEXO 5

Continuar...			Teste de Scheffé para Crescimento Interação entre Estirpes e pH					
ESTIRPES	PH	DIAS	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
			5.060000	1.800500	4.090000	2.285000	5.160000	1.617500
21	6	(1)		.000000	.004160	.000000	.999999	.000000
21	7	(2)	.000000		.000000	.632973	.000000	.999726
22	6	(3)	.004160	.000000		.000000	.001001	.000000
22	7	(4)	.000000	.632973	.000000		.000000	.165652
23	6	(5)	.999999	.000000	.001001	.000000		.000000
23	7	(6)	.000000	.999726	.000000	.165652	.000000	
24	6	(7)	.912764	.000000	.492083	.000000	.705521	.000000
24	7	(8)	.000000	1.000000	.000000	.372040	.000000	1.000000
33	6	(9)	.152469	.000000	.000000	.000000	.362607	.000000
33	7	(10)	.000000	.000363	.000311	.186589	.000000	.000024
34	6	(11)	.999846	.000000	.000347	.000000	1.000000	.000000
34	7	(12)	.000000	.898908	.000000	1.000000	.000000	.448516

Continuar...			Teste de Scheffé para Crescimento Interação entre Estirpes e pH					
ESTIRPES	PH	DIAS	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
			4.663333	1.712500	5.736000	2.940000	5.232500	2.206667
21	6	(1)	.912764	.000000	.152469	.000000	.999846	.000000
21	7	(2)	.000000	1.000000	.000000	.000363	.000000	.898908
22	6	(3)	.492083	.000000	.000000	.000311	.000347	.000000
22	7	(4)	.000000	.372040	.000000	.186589	.000000	1.000000
23	6	(5)	.705521	.000000	.362607	.000000	1.000000	.000000
23	7	(6)	.000000	1.000000	.000000	.000024	.000000	.448516
24	6	(7)		.000000	.003010	.000000	.503717	.000000
24	7	(8)	.000000		.000000	.000099	.000000	.712091
33	6	(9)	.003010	.000000		.000000	.575198	.000000
33	7	(10)	.000000	.000099	.000000		.000000	.148111
34	6	(11)	.503717	.000000	.575198	.000000		.000000
34	7	(12)	.000000	.712091	.000000	.148111	.000000	



## ANEXO 6

GENERAL MANOVA			Teste de Scheffé - Biomassa								
			Interação entre Estirpes e pH								
ESTIRPES PH			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
			.053625	.017400	0.000000	.019600	.012250	0.000000	.040425	.008247	0.000000
21	6	{1}		.000	.000	.000	.000	.000	.769	.000	.000
21	7	{2}	.000		.263	1.000	1.000	.263	.016	.991	.263
21	8	{3}	.000	.263		.197	.861	1.000	.000	.997	1.000
22	6	{4}	.000	1.000	.197		1.000	.197	.120	.961	.197
22	7	{5}	.000	1.000	.861	1.000		.861	.001	1.000	.861
22	8	{6}	.000	.263	1.000	.197	.861		.000	.997	1.000
23	6	{7}	.769	.016	.000	.120	.001	.000		.000	.000
23	7	{8}	.000	.991	.997	.961	1.000	.997	.000		.997
23	8	{9}	.000	.263	1.000	.197	.861	1.000	.000	.997	
24	6	{10}	.067	.785	.000	.968	.224	.000	.997	.038	.000
24	7	{11}	.000	.979	.999	.933	1.000	.999	.000	1.000	.999
24	8	{12}	.000	.263	1.000	.197	.861	1.000	.000	.997	1.000
33	6	{13}	.001	.998	.004	1.000	.777	.004	.541	.290	.004
33	7	{14}	.020	.730	.000	.961	.156	.000	.986	.020	.000
33	8	{15}	.000	.263	1.000	.197	.861	1.000	.000	.997	1.000
34	6	{16}	.000	.999	.006	1.000	.846	.006	.450	.368	.006
34	7	{17}	.000	1.000	.358	1.000	1.000	.358	.053	.993	.358
34	8	{18}	.000	.263	1.000	.197	.861	1.000	.000	.997	1.000

GENERAL MANOVA			Teste de Scheffé - Biomassa								
			Interação entre Estirpes e pH								
ESTIRPES PH			{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}
			.031500	.007540	0.000000	.025375	.030950	0.000000	.024675	.017833	0.000000
21	6	{1}	.067	.000	.000	.001	.020	.000	.000	.000	.000
21	7	{2}	.785	.979	.263	.998	.730	.263	.999	1.000	.263
21	8	{3}	.000	.999	1.000	.004	.000	1.000	.006	.358	1.000
22	6	{4}	.968	.933	.197	1.000	.961	.197	1.000	1.000	.197
22	7	{5}	.224	1.000	.861	.777	.156	.861	.846	1.000	.861
22	8	{6}	.000	.999	1.000	.004	.000	1.000	.006	.358	1.000
23	6	{7}	.997	.000	.000	.541	.986	.000	.450	.053	.000
23	7	{8}	.038	1.000	.997	.290	.020	.997	.368	.993	.997
23	8	{9}	.000	.999	1.000	.004	.000	1.000	.006	.358	1.000
24	6	{10}		.027	.000	1.000	1.000	.000	1.000	.893	.000
24	7	{11}	.027		.999	.223	.013	.999	.290	.985	.999
24	8	{12}	.000	.999		.004	.000	1.000	.006	.358	1.000
33	6	{13}	1.000	.223	.004		1.000	.004	1.000	1.000	.004
33	7	{14}	1.000	.013	.000	1.000		.000	1.000	.870	.000
33	8	{15}	.000	.999	1.000	.004	.000		.006	.358	1.000
34	6	{16}	1.000	.290	.006	1.000	1.000	.006		1.000	.006
34	7	{17}	.893	.985	.358	1.000	.870	.358	1.000		.358
34	8	{18}	.000	.999	1.000	.004	.000	1.000	.006	.358	

## ANEXO 7

GENERAL MANOVA		Teste de Scheffé Diferenças entre as estirpes						
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
ESTIRPES DIAS		0.000000	7.500000	8050000	7.678000	7.710000	7.386000	7.990000
C	(1)		.000000	.008205	.000000	.000000	.000000	.000000
21	(2)	.000000		.000000	.963725	.921806	.996443	.153810
22	(3)	.008205	.000000		.000000	.000000	.000000	.000000
23	(4)	.000000	.963725	.000000		.999998	.716840	.651082
24	(5)	.000000	.921806	.000000	.999998		.610365	.754277
33	(6)	.000000	.996443	.000000	.716840	.610365		.039758
34	(7)	.000000	.153810	.000000	.651082	.754277	.039758	

## ANEXO 8

Continue...		Teste de Scheffé para Ergosterol Efeito das Estirpes						
ESTIRPES		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
C	(1)	602.4318	168.7173	514.0397	163.6175	185.6775	187.8042	186.9911
21	(2)	.000002		.845581	.000002	.000005	.000005	.000005
22	(3)	.845581	.000102		.000082	.000215	.000236	.000228
23	(4)	.000002	1.000000	.000082		.999796	.999652	.999715
24	(5)	.000005	.999956	.000215	.999796		1.000000	1.000000
33	(6)	.000005	.999912	.000236	.999652	1.000000		1.000000
34	(7)	.000005	.999932	.000228	.999715	1.000000	1.000000	