

**CITOLOGIA E FERTILIDADE DE CULTURAS  
MONOSPÓRICAS E RESULTADOS DE  
CRUZAMENTOS DO COGUMELO *Agaricus  
blazei* CS1**

**RÔMULO CÉSAR CLEMENTE TOLEDO**

**2006**

**RÔMULO CÉSAR CLEMENTE TOLEDO**

**CITOLOGIA E FERTILIDADE DE CULTURAS MONOSPÓRICAS E  
RESULTADOS DE CRUZAMENTOS DO COGUMELO *Agaricus blazei*  
CS1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

**Orientador  
Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

*Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da*  
**Biblioteca Central da UFLA**

Toledo, Rômulo César Clemente

Citologia e fertilidade de culturas monospóricas e resultados de cruzamentos do cogumelo *Agaricus blazei* CS 1 / Rômulo César Clemente  
Toledo. -- Lavras : UFLA, 2006.

51 p. : il.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1.Citologia. 2. Cultura Monospóricas. 3. Fertilidade. 4. Basidiomiceto.  
5. *Agaricus blazei*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.8

**RÔMULO CÉSAR CLEMENTE TOLEDO**

**CITOLOGIA E FERTILIDADE DE CULTURAS MONOSPÓRICAS E  
RESULTADOS DE CRUZAMENTOS DO COGUMELO *Agaricus blazei*  
CS1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 15 de março de 2006

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

UFLA

Profa. Dra. Marisa Vieira Queiroz

UFV

**Prof. Eustáquio Souza Dias  
UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

A minha amada esposa, Luciana Dias Leal Toledo, pelo amor, carinho, apoio incondicional, amizade, companheirismo, incentivo e sinceridade,

ofereço

Aos meus pais, Reinaldo e Maria José, porque sempre se esforçaram ao máximo para que eu pudesse chegar até aqui, amo vocês; aos meus irmãos Reinaldo e Kelly, pelo apoio e incentivo; a minha avó "Petita", estou no caminho de cumprir minha promessa vovó; ao meu avô, José "Mestre", "in memoriam", saudades; aos meus sogros Antônio e Alzira pelo apoio, ajuda e compreensão em todos os momentos; a minha avó Conceição, pelo carinho; aos meus amados irmãos em Cristo, Eustáquio e Maria Aparecida, por terem me recebido com amor e carinho,

dedico

"Aquele que testifica estas coisas diz: Certamente cedo venho. Amém. Ora vem, Senhor Jesus".

Apocalipse 22:20

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu salvador Jesus Cristo por sua infinita misericórdia, amor e pelo cumprimento de sua promessa. “Louvado seja o seu nome, amém, amém...”.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Eustáquio, pelos ensinamentos, exortações e oportunidade.

Á minha esposa Luciana, pois sempre esteve ao meu lado, sempre me apoiou, mesmo quando pensei em desistir.

Aos meus pais, pelo amor e carinho, e aos meus irmãos pelo apoio.

Aos professores(as) Romildo, Rosane e Patrícia, por terem disponibilizado os laboratórios, e por me ensinarem a trilhar um novo caminho, como docente.

À minha ajudante, Ana Paula, por sua responsabilidade e por haver me ajudado neste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, Sandra, Lucas, João Borges, Débora, Thaís, Felix, Euziclei, Evânia, Patrícia, Gisele e Nina, que em algum momento desta caminhada me ajudaram.

Aos estagiários Graziela, Karina e Emerson, pela ajuda e apoio. A Evani e Fábio, pela ajuda, paciência e por terem me ensinado muitas coisas.

Às queridas Zélia, Rafaela e Magda, pois sempre me trataram com carinho, e sempre que precisei, me ajudaram sem medir esforços.

A todos que, de alguma forma e em algum momento, me ajudaram a alcançar este sonho, o meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2.REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Aspectos taxonômicos do <i>Agaricus blazei</i> .....	3
2.2 Morfologia .....	4
2.2.1 Monocarioto ou dicarioto .....	5
2.2.2 Tipos de reação sexual (“mating type”) .....	7
2.2.2.1 Heterotalismo.....	8
2.2.2.2 Homotalismo.....	9
2.2.2.3 Pseudo-homotalismo.....	9
2.3 Germinação de esporos .....	10
2.4 Reprodução dos basidiomicetos .....	13
2.5 Características citológicas .....	14
2.6 Preservação de linhagens .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Isolado .....	16
3.1.1 Germinação de esporos de <i>A. blazei</i> em meio líquido .....	16
3.1.2 Culturas monospóricas.....	16
3.2 Avaliação da produtividade de culturas do isolado CS1 preservadas sob diferentes condições .....	18
3.3 Avaliação da produtividade de culturas de <i>A. blazei</i> obtidas após diferentes ciclos de repicagem.....	19
3.4 Determinação do fator que induz a germinação dos esporos de <i>A. blazei</i> .....	19
3.5 Cruzamento das culturas monospóricas de <i>A. blazei</i> .....	21
3.6 Avaliação do crescimento micelial das culturas de <i>A. blazei</i> .....	22
3.7 Indução da frutificação das cultura monospóricas e F1 crescidas em composto .....	23
3.8 Avaliação citológica de hifas .....	23
3.8.1 Preparação citológica .....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1 Avaliação da produtividade do isolado CS1 preservado sob diferentes condições .....	25
4.2 Avaliação da produtividade de culturas repicadas do isolado CS1...	27
4.3 Germinação de basidiósporos de <i>Agaricus blazei</i> para a obtenção de culturas monospóricas .....	28
4.4 Avaliação das culturas monospóricas de <i>A. blazei</i> .....	32

4.5 Avaliação do crescimento micelial das culturas de <i>A. blazei</i> .....	34
4.6 Avaliação citológica de hifas .....	39
5 CONCLUSÃO .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
ANEXO .....	48



## RESUMO

TOLEDO, Rômulo César Clemente. **Citologia e fertilidade de culturas monospóricas e resultados de cruzamentos do cogumelo *Agaricus blazei* CS1**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.\*

O melhoramento genético tem sido uma das principais estratégias visando ao aumento da produtividade e ou desempenho em várias atividades agropecuárias. No cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* no Brasil, vários aspectos ainda podem ser explorados com vista ao aumento de produtividade, sendo que o melhoramento genético uma estratégia que merece ser considerada em um futuro recente. Para isso, o conhecimento de estabilidade genética de culturas preservadas em laboratório e a elucidação do comportamento nuclear e sexual da espécie são pré-requisitos fundamentais. Neste trabalho foi testada a produtividade de culturas preservadas em laboratório e culturas repicadas por diferentes períodos de tempo. Também foram obtidas culturas monospóricas, cujo padrão nuclear foi estudado, bem como das culturas resultantes dos cruzamentos entre as mesmas. Algumas destas culturas foram também avaliadas quanto ao crescimento micelial em meios de cultura e em composto, além de serem avaliadas quanto à capacidade de frutificação. Para a obtenção das culturas monospóricas, a melhor taxa de germinação obtida foi de 2,1% quando utilizou-se cloranfenicol no meio de cultura. Os resultados mostraram que culturas preservadas ou repicadas por diferentes períodos não perderam sua capacidade de frutificação. As culturas monospóricas apresentaram hifas multinucleadas com média de 6 núcleos nos compartimentos intermediários enquanto que o ápice das hifas apresentou variação de 2 a 3 núcleos. Nos experimentos de cruzamento foi possível observar reação positiva entre alguns isolados monospóricos. Não foi possível observar um padrão distinto de crescimento micelial e nem do número de núcleos entre culturas monospóricas e resultantes de cruzamentos. Verificou-se que as culturas monospóricas IS02, IS03, IS07, IS17 e IS19 e as culturas F1 IS03/17 e F1 EG01/EG02 resultantes de cruzamento são férteis, sugerindo que este cogumelo pode apresentar um ciclo de vida anfitálico. Maior número de culturas monospóricas deverão ser testadas quanto à fertilidade, para confirmação destes resultados.

---

\* Orientador: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

## ABSTRACT

TOLEDO, Rômulo César Clemente. **Monosporic cultures cytology and fertility and *Agaricus blazei* CS1 mating results.** Dissertation (Master degree in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.\*

Genetic breeding has been one of the main strategies aiming the improvement of productivity and or development in several agricultural and cattle growing activities. Concerning mushrooms in Brazil, several aspects can still be exploited for productivity increasing; the genetic breeding is a strategy which deserves to be considered in a recent future. Thus, the genetic stability of the cultures preserved in laboratories and the elucidation of nuclear and sexual behavior of the species are essential. In this work, the productivity of the cultures preserved in laboratory and the ones picked in different periods of time were tested. Monosporic cultures were also obtained; their nuclear pattern has been studied, as well as the resulting cultures of the offspring. Some of these cultures were also assessed regarding their mycelia growing in culture media and compost. They were also evaluated concerning their fructification capacity. The best obtained germination level was 2.1% when using chloramphenicol in the culture media for monosporic culture obtaining. The results have shown that the preserved or picked cultures in different time periods did not lose their fructification capacity. The monosporic cultures have shown a 6 nucleus average in midway compartments multinucleated hyphas, whereas the top hyphas presented a range of 2 to 3 nucleus. It was possible to observe positive reaction among some monosporic isolate in mating tests. It was not possible to observe a distinctive mycelium growth pattern, nor the nucleus number among monosporic and mating resulting cultures. It was found that IS02, IS03, IS17 and IS19 monosporic cultures as well as the offspring cultures F1 IS03/IS17 and F1 EG01/EG02 are fertile; which suggests that this mushroom may have an amphithallic life cycle. A greater number of monosporic cultures will be tested on their fertility so these results can be confirmed.

---

\* Advisor: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo e o estudo do *Agaricus blazei* são recentes no Brasil e, embora já existam vários artigos publicados, verificou-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a genética e a fisiologia deste basidiomiceto, visando a seleção de linhagens e ao melhoramento genético.

Com a crescente competitividade do setor, os produtores brasileiros precisam melhorar a sua produtividade, com uso de tecnologia mais apropriada. Além dos estudos para o desenvolvimento de técnicas mais adequadas, é importante, a longo prazo, estabelecer um programa de melhoramento genético da espécie. Considerando o “status” do *A. blazei* como um cogumelo medicinal, é importante que esse programa seja consolidado pelo uso de metodologias convencionais, evitando a obtenção de linhagens geneticamente modificadas por meio de técnicas de engenharia genética, as quais poderiam gerar rejeição por parte de um mercado consumidor exigente. Portanto, a estratégia mais apropriada é a do melhoramento clássico, que exige o cruzamento entre linhagens com características desejáveis.

Os fungos caracterizam-se por apresentar diferentes tipos de cruzamento e, por isso, para a condução de estudos genéticos, é importante conhecer o “mating type” da espécie estudada.

Estudos citológicos recentes demonstraram que o *A. blazei* possui hifas multinucleadas, contendo de 6 ou 8 núcleos, sendo, portanto, diferente do padrão dicariótico clássico apresentado por muitos basidiomicetos. Portanto, torna-se clara a necessidade de se elucidar o comportamento deste fungo durante o seu ciclo sexual.

Neste aspecto, o conhecimento do padrão nuclear e da fertilidade de culturas monospóricas são importantes ferramentas para a elucidação do “mating type” de um fungo. Por isso, neste trabalho foram desenvolvidas e ou adaptadas metodologias de germinação de esporos e coloração de núcleos de hifas a partir de culturas monospóricas e de culturas resultantes de cruzamento, além da avaliação da fertilidade das mesmas.

Outro aspecto importante na condução de um programa de melhoramento genético é a utilização de uma metodologia de preservação de culturas fúngicas, com manutenção da capacidade de frutificação. Por isso, este trabalho descreve também a avaliação da frutificação de diferentes culturas do isolado CS1, preservadas por diferentes períodos de tempo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos taxonômicos do *Agaricus blazei*

O *Agaricus blazei* é classificado como fungo verdadeiro, pertencente ao reino Fungi, divisão Basidiomycota, ordem Agaricales, família Agaricaceae. Apresenta corpo de frutificação visível a olho nu, conhecido como basidiocarpo ou cogumelo, tendo como características o estipe central separado do píleo, lamelas livres, acinzentadas quando jovens, tornando-se marrom-escuras na maturidade (Urben, 2001).

Wasser et al. (2002), com base em estudos sobre as estruturas reprodutivas propuseram que o cogumelo nativo do Brasil deve ser considerado uma nova espécie (*Agaricus brasiliensis*) ou referido como *Agaricus blazei* ss. Heineeman.

Por outro lado, recentes estudos por meio do seqüenciamento da região ITS do rDNA do basidiomiceto *A. blazei* apontam para novas possibilidades de classificação. Segundo Kerrigan (2005), este cogumelo foi primeiramente descrito em 1893, pelo botânico americano C. H. Peck, a partir de exemplares cultivados no estado de Nova York, Estados Unidos, tendo recebido o nome de *A. subrufescens*. Ao analisar diferentes isolados obtidos de várias regiões, inclusive do Brasil, por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA, o autor concluiu que, de fato, o cogumelo brasileiro é diferente do *A. blazei* classificado por Murril, porém não se trata de uma nova espécie, mas sim da espécie descrita por Peck. O autor conclui que, segundo as normas de nomenclatura botânica, devemos utilizar o nome de maior antecedência, ou seja *A. subrufescens*.

No Brasil há ainda uma utilização do nome “*A. sylvaticus* Shaeffer”, que constitui um erro taxonômico, pois o nome correto

relatado na literatura é *A. silvaticus* Schaeffer, o qual se refere a uma espécie de clima temperado e que possui propriedades tóxicas para o homem, não sendo, portanto, aconselhável para o consumo (Dias et al., 2004).

Considerando que o assunto ainda será alvo de controvérsias, neste trabalho será mantido ainda o nome *A. blazei* para este cogumelo.

## **2.2 Morfologia**

Membros da divisão Basidiomycota, comumente referidos como basidiomicetos, são os fungos que, durante seu processo sexual, produzem basidiósporos haplóides sobre um basídio (Carlile, 1994).

Outra característica deste grupo, embora não esteja presente em todas as espécies, são os grampos de conexão ligando as células adjacentes. Os grampos de conexão são formados para manter a condição dicariótica e heterocariótica da hifa. Eles são formados na posição onde o novo septo irá aparecer entre os dois núcleos. Como resultado de um mecanismo coordenado da formação do grampo de conexão e a divisão nuclear, a ordem dos núcleos é revertida entre as células apical e subapical em cada divisão celular. Portanto, ocasionalmente, mais de dois núcleos podem ser encontrados em células dicariotas de *C. cinereus*, e em outras espécies homocarióticas que também possuem o grampo de conexão, ou quando é formado um dicarioto perfeito sem a presença de grampo de conexão (Kües, 2000).

As hifas dos basidiomicetos podem ser mononucleadas, binucleadas, multinucleadas ou até mesmo, em algumas espécies, possuir três núcleos (Kües, 2000). A hifa do basidiomiceto *A. blazei* é

septada, com compartimentos bem definidos, multinucleada, contendo de 6 a 8 núcleos (Labory et al, 2003).

Hifas monocarióticas apresentam, geralmente, 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro. São geralmente caracterizadas por um septo simples com um “dolipore”, que é típico para fungos basidiomicetos. Estes poros permitem a passagem de pequenas organelas, como as mitocôndrias, mas, a passagem de organelas maiores, como os núcleos, é bloqueada. Contudo, após a plasmogamia, pode ocorrer a migração do núcleo em *Coprinus cinereus*, a uma velocidade de 1 a 3  $\text{mm h}^{-1}$ , que é 20 vezes mais rápida do que o crescimento normal da hifa. Durante a migração do núcleo podem ou não ocorrer divisões mitóticas regulares do núcleo. A idade influencia extremamente na taxa de migração nuclear e pode ter também um efeito na atividade mitótica do núcleo na fusão da hifa (Kües, 2000).

Após a formação do dicarioto não existe nenhuma restrição quanto à fusão da hifa com outras monocariotas ou dicariotas, mas, em contraste com as hifas monocariotas, as dicariotas não permitem a invasão de núcleos. Por outro lado, um ou ambos os tipos de núcleos da hifa dicariota podem entrar no micélio monocarioto quando ocorre uma fusão dicarioto-monocarioto, produzindo um ou dois novos micélios dicariotos (Kües, 2000).

Vários fatores morfológicos são importantes para o conhecimento do ciclo de vida de um fungo, como: cariótipo do núcleo e característica da hifa (homo, hetero ou pseudo-homotática).

### 2.2.1 Monocarioto ou dicarioto

Segundo Kües (2000), fungos homocarióticos são aqueles que possuem micélio constituído, geralmente, por núcleos haplóides idênticos. Em contrapartida, fungos heterocarióticos possuem hifas geralmente constituídas de núcleos haplóides diferentes.

Kerrigan et al. (1992) relataram que o basidiomiceto *A. bisporus* apresenta hifas heterocarióticas, sendo incomum a ocorrência de hifas homocarióticas a partir de esporos germinados.

Em algumas espécies, como o *C. cinereus*, apenas as células dicariotas são férteis (Kües, 2000).

Em muitos basidiomicetos há diferentes fatores de cruzamento (“mating types”). Em *C. cinereus*, o controle genético durante o cruzamento é realizado pelos “mating type” A e B. Para que ocorra um cruzamento bem sucedido, os “mating types” devem ser diferentes, de modo a formar um dicarioto. Por outro lado, podem ocorrer fusões de hifas (anastomose), mesmo não estando presentes diferentes “mating type”. Caso apresente um monocarioto diferente no locus B do “mating type”, mas não em A, tem-se o chamado A heterocarioto que não possui diferença morfológica em relação à hifa monocariótica, contudo estas estirpes, geralmente são menos vigorosas e crescem mais vagarosamente. Mas se o locus A é diferente e o locus B igual, é gerado o chamado B heterocarioto, resultando em hifas com crescimento tão vigoroso quanto o encontrado em dicariotos e que é caracterizado pela não formação de grampo de conexão na hifa septada. Um B heterocarioto pode formar corpo de frutificação, mas não tão prontamente como o dicarioto, enquanto que a formação de corpo de frutificação em um A heterocarioto é uma exceção (Kües, 2000; Kronstad & Staben, 1997).



Kerrigan et al. (1992, 1994) sugerem alguns critérios para a determinação de isolados homocariotos em *Agaricus bisporus*: 1) morfologia da colônia, que pode ser apropriada para dieterocariotização, mas pode ser inapropriada para classificar várias progêneses mitóticas; 2) taxa de crescimento, em que homocariotos apresentam taxa de crescimento menor que os heterocariotos, sendo este dado usado cotidianamente em práticas industriais; 3) auxotrofia, em que os descendentes homocariotos (e alguns descendentes heterocariotos) incompatíveis provenientes de pais auxotróficos, serão auxotróficos; 4) marcas de codominância: aloenzimas e polimorfismo de fragmento de restrição de DNA (RFLP), têm sido usados para determinar se os isolados são heterocarióticos, mas este é apenas um teste parcial, devido ao fato da indicação de homocariose ser ambígua; 5) fertilidade: a ploidia e compatibilidade de "mating-type" podem interferir na frutificação de um heterocarioto e além disso, outros dois pontos podem interferir, o fato de os isolados monocarióticos de *A. bisporus* poderem frutificar e o de que, na literatura, existem poucas tentativas de interpretar diferenças na frutificação quando se leva em conta a ploidia; 6) número de esporos por basídio, sendo que basídios com três e quatro esporos apresentam maior possibilidade de serem homocariotos do que aqueles com dois esporos; 7) teste de cruzamento entre culturas monospóricas, sendo o resultado positivo indicado pela formação de micélio penuginoso aéreo na linha de junção entre duas culturas homocariotas. A confirmação do micélio heterocarioto formado pode ser feita por meio de marcas de aloenzima.

### **2.2.2 Tipos de reação sexual (“mating type”)**

Os fungos apresentam um sistema genético que previne o cruzamento entre células geneticamente iguais; este sistema é chamado de “mating system”. De acordo com este sistema as espécies podem ser: heterotáticas (do grego, *hetero* = diferente, *talos* = broto jovem), homotático (do grego, *homo* = igual), homotático secundário ou pseudo-homotático (Carlile, 1994).

#### **2.2.2.1 Heterotalismo**

O fungo heterotático ocorre quando cada esporo recebe apenas um núcleo pós-meiótico e em que prevalece um sistema de incompatibilidade. Há dois tipos de sistemas de incompatibilidade: um sistema unifatorial, em que a sexualidade é controlada por um simples fator genético (A), com múltipla especificidade (alelos) e outro sistema bifatorial, no qual a sexualidade é controlada por dois fatores sexuais (A e B), cada um possuindo múltipla especificidade (alelos). Estes sistemas são também chamados de bipolares ou tetrapolares, respectivamente, porque a fertilidade paterna é observada no cruzamento entre os filhos nos dois sistemas. O homocarioto haplóide estéril carrega um simples alelo contendo o fator de incompatibilidade, no caso de ser unifatorial ou um simples alelo contendo os dois fatores de incompatibilidade, no caso de ser bifatorial. A fertilidade resulta quando dois núcleos carregando diferentes alelos se cruzam, originando um dicarioto. Os dois núcleos diferentes irão se unir no basídio e se dividir por meiose. Os alelos de incompatibilidade são segregados na meiose e são distribuídos em quatro núcleos pós-meióticos no basidiósporo. Cada basídio, geralmente, forma quatro esporos e cada esporo, geralmente, recebe

um núcleo pós-meiótico. A partir de cada esporo se desenvolverá um micélio incapaz de se autofertilizar, mas possuindo capacidade de realizar cruzamento com um tipo sexual compatível (Chang & Hayes, 1978).

Kües (2000) descreve que, em *C. cinereus*, os 4 núcleos pós-meióticos formados no basídio migram para cada um dos basidiósporos e, em seguida, ocorre uma mitose no interior do esporo formado, fazendo com que cada basidiósporo passe a ter dois núcleos de mesmo "mating type".

Callac et al. (1998) relatou a ocorrência de isolados de *A. bisporus* var. *burnettii*, que possuem 4 esporos por basídio, os quais são homocariotos e com característica de ciclo de vida heterotálico.

#### **2.2.2.2 Homotalismo**

Também conhecido como homotálico primário, este sistema de sexualidade não parece envolver fatores de incompatibilidade. O micélio autofertilizável se desenvolve a partir de um simples esporo contendo, em seu interior, um simples núcleo pós-meiótico, não sendo detectado nenhum fator de incompatibilidade. O micélio fértil é homocariótico, possuindo, geralmente, núcleos idênticos. Ele pode ser dicariótico, com ou sem grampo de conexão, mas, na maioria das vezes, é multicariótico, sem grampo de conexão. Cariogamia e meiose ocorrem regularmente dentro do basídio no corpo de frutificação, mas, a fase heterocariótica está ausente no seu ciclo de vida. Segregação e recombinação de diferentes genomas, portanto, não ocorrem normalmente. A recombinação pode ocorrer em raras ocasiões, quando um núcleo

participante sofre algum tipo de mudança por meio de mutação (Chang & Hayes 1978).

### **2.2.2.3 Pseudo-homotalismo**

O fungo pseudo-homotático ou homotático secundário, possui fator de incompatibilidade, o qual é determinado por um mecanismo de distribuição nuclear. O basídio de um pseudo-homotático carrega, geralmente, apenas dois esporos cada. Dois núcleos compatíveis migram para dentro de cada um dos esporos, sendo o micélio que se desenvolve a partir deles autofertilizável e intrinsecamente heterotático para o fator de incompatibilidade. O micélio fértil é heterocarioto, geralmente com dois núcleos de tipos nucleares diferentes. Ele, geralmente, é dicarioto com grampos de conexão, mas também pode ser dicarioto sem grampo de conexão ou multicarioto sem grampo de conexão. A fase homocariótica está ausente no seu ciclo de vida. Ele pode apresentar as formas unifatorial ou bifatorial de controle e se distingue de um fungo heterotático quando os núcleos pós-meióticos são distribuídos no basidiósporo, sendo distribuído dois núcleos de cada "mating type" por esporo para o pseudo-homotático (Chang & Hayes, 1978).

Callac et al. (1998) relatou a ocorrência de isolados de *Agaricus bisporus* var. *bisporus*, que são bispóricos produzindo esporos heterocarióticos (n+n) com característica de ciclo de vida pseudo-homotática (ou homotático secundário). Neste sistema, cada um dos dois esporos recebem dois núcleos de "mating type" diferentes e, ao germinarem, produzem micélios heterocarióticos férteis.

Callac et al. (1998) afirmou existir, aproximadamente, 500 espécies de *Agaricus* e que 9% são consideradas amfitáticas, sendo, ao

mesmo tempo, pseudo-homotáticas e heterotáticas, produzindo esporos heterocarióticos ou homocarióticos, possuindo apenas um sistema de incompatibilidade sexual (unifatorial).

Kerrigan (2005) demonstrou que os cogumelos *A. subrufescens*, isolados nos Estados Unidos e o *A. blazei*, descoberto no Brasil, representam a mesma espécie biológica, embora eles estejam distantes geograficamente e possuem ciclo de vida anfitálico.

### **2.3 Germinação de esporos**

Em muitos fungos, a germinação de esporos se dá pela formação de um tubo germinativo que pode ser alongado e septado para a formação do micélio e o aumento do volume do esporo no momento da germinação é desprezível, enquanto que em outros é significativo. Durante o período de dormência não ocorre síntese de DNA e RNA no esporo, contudo, existem estudos que comprovam alguma atividade celular, provavelmente relacionada à manutenção da viabilidade. Durante a germinação, as atividades metabólicas são restauradas ao nível daquelas encontradas em células vegetativas (Carlile, 1994).

Vários fatores podem influenciar na germinação de esporos fúngicos, dentre eles, os fatores nutricionais, físicos e químicos (Carlile, 1994).

Muitas espécies necessitam de água para germinação, outras necessitam apenas de uma taxa de umidade mais elevada, enquanto o simples contato com a água pode levar o esporo à morte. Muitos fungos são aeróbicos obrigatórios ou facultativos e a presença de oxigênio é, geralmente, necessária para a germinação. A presença de dióxido de carbono também é relatada, possivelmente como um iniciador de

reações bioquímicas. A temperatura é outro limitador na germinação dos esporos, tendendo a ser próxima da temperatura do crescimento vegetativo. A intensidade da luz, bem como a escuridão também foi reportada. Nutrientes hidrossolúveis como açúcares e aminoácidos, que normalmente existem na natureza, também são requeridos para a germinação de esporos. O fungo *Fusarium culmorum* requer carbono e uma fonte de nitrogênio (Carlile, 1994).

Segundo French (1992), muitos compostos voláteis podem estimular ou inibir a germinação de esporos em fungos. Muitos deles estão presentes naturalmente na natureza como componentes de aromas, flavors e ou óleos essenciais, podendo apresentar grupos funcionais. Geralmente, todos os compostos são hidrocarbonetos e podem ter grupamentos hidroxil (- OH), carbonil (-C=O), aldeído (-CH=O), carboxil (-COOH), amina (NH<sub>2</sub>), sulfidril (-SH) ou outro grupo funcional.

A solubilidade é importante para que haja a interação entre o composto químico com fatores biológicos que possibilitem a permeabilidade da membrana. O vapor de água também é considerado um importante cofator que alavanca ou ativa a resposta volátil (French, 1992).

Os compostos voláteis estimulam a germinação de vários fungos da divisão Basidiomycota, dentre eles da ordem Agaricales, como *Agaricus bisporus*, cuja germinação é estimulada pelo ácido isovalérico e álcool isoamílico; *A. campestris* tem a germinação estimulada pelo 2,3-dimetil-1-penteno; da ordem Boletales, *Suillus granulatus* e *S. luteus* com germinação estimulada pelo ácido abiótico; da ordem Uredinales, mais de 25 espécies foram relatadas como sendo estimuladas por diversos compostos voláteis, dentre eles nonanal, 6-metil-5-hepten-2-

ona, 5-metil-2-hexanona e benzonitrila, entre outros compostos; da ordem Ustilaginales, *Urocystis tritici* Korn, com germinação estimulada pelo benzaldeído, *Ustilago avenae* e *U. tritici*, com germinação estimulada pelo nonanol; *U. zaeae* com germinação estimulada pelo 6-metil-5-hepten-2-ona (French, 1992).

Kerrigan (1994) obteve, no primeiro fluxo de frutificação de uma estirpe de *Agaricus bisporus*, uma taxa de germinação estimada em 26%, utilizando 0,01% de ácido isovalérico.

Bonello (1998) relatou que a adição de ácido abiótico induziu a germinação de esporos do basidiomiceto ectomicorrízico *Suillus pungens*. James & Buckner (2004) utilizaram lipídios de planta e de larvas de abelhas para induzir a germinação do ascomiceto *Ascosphaera aggregata*.

Magné (1997) introduziu um fragmento de micélio dicariótico no meio de cultura para induzir a germinação de esporos do cogumelo comestível *Stropharia rugoso-annulata*.

Segundo French (1992), tubos germinativos de *Gigaspora gigantea* são atraídos por compostos voláteis. O mesmo autor relatou que foram identificados compostos voláteis liberados por *Streptomyces orientalis* que estimularam a germinação de esporos de *Gigaspora margarita* e *Glomus mosseae*.

## **2.4 Reprodução dos basidiomicetos**

O processo sexual dos fungos envolve, segundo Carlile (1994), três passos. O primeiro é a plasmogamia, que ocorre entre duas células haplóides, mononucleadas e geneticamente diferentes. O segundo passo é a cariogamia, ou fusão dos núcleos, que ocorre no basídio.

Finalmente, ocorre a meiose restaurando o estado haplóide, ocorrendo também no basídio, convertendo uma célula diplóide em quatro células haplóides (basidiósporos).

Após a plasmogamia, as hifas subseqüentes se desenvolvem com dois núcleos por compartimento, um de cada parental. O fungo, então, pode permanecer na forma de micélio dicarioto ou, caso haja condições ambientais específicas, ocorrerá à formação de hifas especializadas, originando o basidiocarpo. Nestas estruturas se desenvolverão os basídios, nas quais ocorrerão a cariogamia e, posteriormente, a meiose, originando quatro basidiósporos que, ao germinarem novamente, produzirão hifas haplóides (Kües, 2000).

Os genes do locus A em *C. cinereus* controlam o pareamento de dois núcleos parentais dentro do dicarioto e induzem a formação do grampo de conexão, sincronizando a divisão nuclear e a consecutiva formação de septo. O gene do locus B codifica feromônios e receptores de feromônios que, em *Schizophyllum commune*, são difundidos no meio induzindo ou não a autofusão (Kües, 2000).

Monocariotos de *Coprinus cinereus* são capazes de produzir abundantes esporos assexuados em estruturas aéreas especializadas chamadas oidióforos. Em dicariotos estas estruturas só são observadas após indução luminosa. Clamidósporos largos também são observados em *C. cinereus*, os quais são mitósporos com parede larga, apresentando formas variáveis e citoplasma condensado, sendo encontrados nas porções marrons no cruzamento micelial e em culturas dicariotas envelhecidas (Kües, 2000).



## **2.5 Características citológicas**

O uso de microscopia permite a visualização de várias características citológicas e morfológicas das hifas, tamanho e aspecto dos esporos, germinação, número de núcleos, bem como divisão e migração.

Segundo Labory et al. (2003), estudos genéticos e citológicos básicos e aplicados são importantes para seleção e ou desenvolvimento de novas linhagens. O comportamento nuclear fornece uma importante definição, tanto para as análises genéticas quanto para a compreensão do ciclo de vida dos fungos.

Análises das características nucleares de esporos de *Agaricus blazei* foram realizadas por Labory et al. (2003) que observaram esporos de 4,3 a 6,2  $\mu\text{m}$ , sendo a maioria uninucleadas, utilizando coloração por Giemsa. Posteriormente, Labory et al. (2003) utilizando coloração de núcleos por fluorescência, verificaram que, na verdade, os basidiósporos de *A. blazei* são binucleados, enquanto que as hifas apresentam 6 ou 8 núcleos por septo, em média.

## **2.6 Preservação de linhagens**

Uma vez obtida a matriz primária de um cogumelo, é necessário conservá-la viável pelo maior tempo possível. Em salas climatizadas (20°C a 26°C) ou em geladeira (4°C a 7°C), as matrizes podem durar até seis meses, desde que acondicionadas em tubos de ensaio com meio de cultura inclinado e vedados com filme de PVC ou, preferencialmente, em tubos com tampa hermética para evitar a desidratação do meio de cultura e da matriz. O uso de óleo mineral, previamente esterilizado, tem se mostrado importante, pois protege o micélio contra a dessecação

resultante da condensação de vapor nas variações de temperatura durante o armazenamento. Algumas culturas, preservadas dessa forma, podem continuar viáveis por até dois anos (Eira 2003).

O *A. blazei*, no entanto, não tolera temperaturas de geladeira, perdendo rapidamente a viabilidade quando mantido a 4°C. Em função disso, Maia (2004) avaliou diferentes condições de temperatura e substrato para a preservação de *A. blazei*, concluindo que as culturas são melhor preservadas a 10°C em substrato à base de arroz em casca com farelo de trigo ou do próprio composto de cultivo do cogumelo. Nestas condições, as culturas mantiveram-se viáveis por, pelo menos, 17 meses, que foi o maior período avaliado.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolado

O isolado de *Agaricus blazei* (CS1) utilizado foi proveniente da Coleção de Fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Ele foi mantido em meio básico completo (MBC) preparado utilizando-se 10g de glicose, 1g de peptona, 1g de extrato de levedura, 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5g de  $\text{CaCl}_2$  e 13g de ágar microbiológico acrescido de micronutrientes (0,1% de  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,07% de  $\text{MnSO}_4$ , 0,04% de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 0,01% de  $\text{CuSO}_4$ ), sendo repicado periodicamente.

#### 3.1.1 Germinação de esporos de *A. blazei* em meio líquido

Foi utilizada uma suspensão contendo  $6,1 \times 10^6$  esporos tendo sido adicionado 1 mL desta suspensão em 100 ml de meio líquido MBC (meio básico completo), acrescido de 200  $\mu\text{L}$  de cloranfenicol e ampicilina (50 mg/mL) e de 100  $\mu\text{L}$  de nistatina (10.000 UI) incubadas em BOD, a 28°C. Os esporos, com seu respectivos tubos germinativos, foram observados em microscópio de luz. Os núcleos foram contados em um microscópio de luz Carl-Zeiss Amplitival utilizando-se objetiva de 40X.

#### 3.1.2 Culturas monospóricas

As culturas monospóricas foram obtidas por dois processos. No primeiro, uma suspensão de  $7,02 \times 10^6$  esporos foi diluída 100 vezes,

sendo inoculados 50  $\mu$ L da diluição em placas de Petri contendo meio MBC acrescido de micronutrientes e 100  $\mu$ L dos antibióticos ampicilina e cloranfenicol (50 mg/mL) e de 100  $\mu$ L do fungicida nistatina (10.000 UI). As placas foram incubadas em BOD, a 28°C até o surgimento das colônias, que ocorreu normalmente, após 10 dias de incubação. As culturas isoladas foram repicadas para novas placas com MBC, sendo designadas de culturas IS. Foram obtidos 50 isolados por este processo, tendo sido escolhidos os 10 isolados que apresentavam maior diferença em relação à característica micelial quando crescidos no meio de cultura.

O segundo processo de obtenção de culturas monospóricas foi a captura dos esporos pré-germinados (contendo tubo germinativo formado), por meio do processo de micromanipulação manual descrito por Camargo Júnior (2004) com algumas modificações. Para a obtenção dos esporos pré-germinados, foi utilizado meio MBC líquido contendo ampicilina, cloranfenicol e nistatina, nas mesmas condições anteriores, o qual foi inoculado com basidiósporos de *A. blazei* na concentração final de  $6,1 \times 10^4$  esporos/mL. O frasco foi mantido sem agitação a 28°C e a germinação dos basidiósporos foi monitorada durante 10 dias. Após a visualização dos esporos pré-germinados, uma pequena gota da suspensão foi transferida para uma lâmina adaptada para micromanipulação manual, contendo uma fina camada de ágar a 13% e levada ao microscópio, o qual também foi adaptado com uma agulha de vidro proveniente de um tubo capilar, de modo a possibilitar a captura de esporos individuais em fase de germinação. Os esporos capturados foram transferidos para pequenos pedaços de ágar livres de qualquer contaminação e, então, transferidos para placas de Petri contendo meio MBC acrescido dos antibióticos ampicilina e cloranfenicol (50 mg/mL) e

incubadas em BOD a 28°C, sendo designadas de culturas EG. Foram obtidas, por este processo, 35 pedaços de ágar contendo esporo pré-germinado, contudo, apenas 3 isolados foram obtidos por este processo.

### 3.2 Avaliação da produtividade de culturas do isolado CS1 preservadas sob diferentes condições

Culturas de *A. blazei* (CS1) preservado em diferentes condições, conforme Tabela 1, foram reativadas, após 17 meses, em meio Ágar Composto e incubadas em BOD a 28°C.

**TABELA 1** Tratamentos de preservação aplicados ao isolado de CS1 de *Agaricus blazei*, segundo Maia (2004).

Tratamento	Substrato	Temperatura
1	Composto *	10°C
2	Composto **	10°C
3	Solo *	10°C
4	Solo **	10°C
5	Controle	28°C

\* Inoculado com discos de micélio em BDA

\*\* Inoculado com micélio em grãos de cereais

O crescimento micelial foi avaliado (mm/dia) após 6 dias em meio composto, sendo avaliadas 5 repetições de cada tratamento. A partir dessas culturas, foram preparados inoculantes de cada cultura, os quais foram utilizados para inoculação do composto de cultivo em sacolas contendo 5 kg de composto para avaliação da produtividade. Como controle, foi utilizado o isolado CS1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 10 repetições e 5 tratamentos (Tabela 1). Efetuaram-se a análise de variância e o teste de média Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com o auxílio do Software Sisvar

4.3, desenvolvido no Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras.

### **3.3 Avaliação da produtividade de culturas de *A. blazei* obtidas após diferentes ciclos de repicagem**

Foi avaliada a produtividade de culturas do isolado CS1 de *A. blazei* repicadas em meio de cultura por diferentes períodos de tempo. A cultura CS1R1 vem sendo repicada no laboratório desde 1998; a cultura CS1R2 foi reisolada a partir de um basidiocarpo e repicada 10 vezes a cada 30 dias; e a cultura CS1R3 foi reisolada de basidiocarpo e repicada apenas uma vez antes de ser usada para o preparo do inoculante.

O composto foi inoculado com as matrizes acima descritas, sendo que o saco apresentava 5 kg de composto. Quando o composto estava inteiramente colonizado, procedeu-se a indução da frutificação, cobrindo-o com 5cm de terra misturada com carvão moído (4:1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições e 3 tratamentos. Efetuaram-se a análise de variância e o teste de médias, conforme descrito nos experimentos anteriores.

### **3.4 Determinação do fator que induz a germinação dos esporos de *A. blazei***

No experimento para a obtenção de culturas monospóricas, percebeu-se que os agentes antimicrobianos usados para evitar contaminações poderiam estar estimulando a germinação. Em função disso, foi montado um experimento para avaliar o efeito desses antimicrobianos na germinação de basidiósporos do *A. blazei*, conforme descrito nas Tabelas 2 e 3.

**TABELA 2** Antimicrobianos utilizados isoladamente ou em combinação para induzir a germinação de esporos de *Agaricus blazei* (Experimento I)

Tratamento	Meio	Antimicrobiano	Álcool 92,8°GL
01	MBC	Cloranfenicol	Presente
02	MBC	Ampicilina	Ausente
03	MBC	Ausente	Ausente
04	MBC	Ampicilina e cloranfenicol	Presente
05	MBC	Ampicilina, cloranfenicol, nistatina	Presente
06	MBC	Cloranfenicol, nistatina	Presente
07	MBC	Ampicilina, nistatina	Ausente

**TABELA 3** Experimento para avaliar o efeito de cloranfenicol e álcool para induzir a germinação de esporos de *Agaricus blazei* (Experimento II)

Tratamento	Meio	Antimicrobiano	Álcool 92,8°GL
08	MBC	Nistatina	Ausente
09	MBC	Cloranfenicol	Presente
10	MBC	Ausente	Presente
11	Composto	Cloranfenicol	Presente
12	Composto	Ausente	Presente

No experimento 1, placas com meio MBC receberam 50 µL de uma suspensão contendo  $5,39 \times 10^6$  esporos/mL. Para cada tratamento, foi espalhado sobre o meio o agente microbiano antes da inoculação com as placas. Para os antibióticos, foram utilizados 100 µL da solução

estoque a 50 mg/mL e para a nistatina foram utilizados 100 µL da solução estoque com 10.000 UI. O cloranfenicol foi preparado em álcool 92,8°GL, enquanto a ampicilina foi preparada em água destilada estéril. O fungicida usado foi a nistatina comercial Nistax<sup>®</sup> (10.000 UI). Após a inoculação, as placas foram incubadas a 28°C até o surgimento das colônias. A taxa de germinação foi avaliada por meio da contagem do número de colônias, sendo que o tempo de avaliação variado de acordo com o tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições para cada tratamento.

No experimento 2, foram utilizados os meios MBC ou meio composto (produzido a partir de 500g de composto para a produção de cogumelo acrescido de 10g de glicose e 13g de agar para 1 litro de meio). Estes tratamentos tiveram como objetivo avaliar se o efeito estimulador sobre a germinação era de fato do cloranfenicol ou do álcool presente na solução ou uma possível interação. Assim as placas contendo MBC ou Ágar Composto receberam 100 µL de solução estoque de cloranfenicol (50mg/ml) ou apenas álcool etílico na concentração final de 1µL/mL do meio. A concentração de esporos e as demais condições, bem como o delineamento experimental, foram os mesmos dos tratamentos anteriores.

### **3.5 Cruzamento das culturas monospóricas de *A. blazei***

As culturas IS02, IS03, IS07, IS09, IS14, IS15, IS17, IS18, IS19, IS24 e CS1 foram cruzadas entre si, em um total de 65 cruzamentos. As culturas EG01, EG02, EG03 e CS1 foram cruzadas entre si, em um total de 9 cruzamentos. Para a realização dos cruzamentos, foram retirados discos de 6 mm de placas contendo micélio novo de cada uma das



culturas citadas e colocados em regiões opostas nas placas de Petri contendo meio de cultura MBC ou meio composto, as quais foram incubadas a 28°C.

### **3.6 Avaliação do crescimento micelial das culturas de *A. blazei***

Foram realizados dois experimentos: no primeiro, em que foi utilizado o meio Ágar Composto, foi avaliado o crescimento micelial das culturas IS02, IS03, IS07, IS09, IS14, IS15, IS17, IS18, IS19, IS24, EG01, EG02, EG03, F1 EG01/EG02, F1 IS03/IS17, F1 IS07/IS19, F1 IS07/IS18, F1 IS09/IS18, F1 IS18/IS24 e do isolado CS1, que é comprovadamente fértil. Foram retirados discos de 6 mm de placas contendo micélio novo de cada uma das culturas citadas, sendo colocados em placas contendo meio Ágar Composto. Foram realizadas 5 repetições de cada isolado, sendo incubadas a 28°C. Para avaliar o crescimento micelial, foi medido o raio das colônias a partir dos discos inoculados nas placas, tendo sido medidos quatro raios por placa, cuja média consistiu em uma repetição. Os resultados foram transformados em mm/dia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

No segundo experimento, foi avaliado o crescimento micelial das culturas monospóricas e resultantes dos cruzamentos no composto de cultivo de *Agaricus blazei*, em sacolas contendo 1 quilo de composto. A inoculação foi realizada por meio de inoculantes de cada isolado, produzido em substrato à base de arroz em casca com farelo de trigo, sendo realizadas 5 repetições para cada cultura. O crescimento micelial foi medido verticalmente a partir da superfície do composto e o resultado dado em mm/dia. O substrato do inoculante foi produzido com 80% de arroz em casca e 20% de farelo de trigo. Também foi avaliado se os

diferentes meios influenciaram a taxa e o tempo de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Como controle, foi utilizado o isolado CS1.

### **3.7 Indução da frutificação das cultura monospóricas e F1 crescidas em composto**

As culturas IS02, IS03, IS07, IS09, IS14, IS15, IS17, IS18, IS19, IS24, EG01, EG02, EG03, F1 EG01/EG02, F1 IS003/IS17, F1 IS07/IS19, F1 IS07/IS18, F1 IS09/IS18, F1 IS18/IS24, CS1 crescidas em composto foram induzidas em sacos plásticos de 2 quilos, tendo sido adicionados sobre o composto colonizado 5 cm de terra de cobertura (75% de terra e 25% de carvão vegetal moído e coado). A terra de cobertura foi umedecida com o cuidado de não ser encharcada. Os sacos foram mantidos em casa de cultivo com temperatura variando de 24,5 a 26,0 °C e umidade relativa do ar mantida sempre acima de 80%. Tendo sido avaliado a fertilidade das culturas monospóricas em relação a cultura CS1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento.

### **3.8 Avaliação citológica de hifas**

#### **3.8.1 Preparação citológica**

Para a coloração dos núcleos dos basidiósporos, foram utilizados procedimentos descritos por Roane (1952), com algumas modificações. Os isolados IS02, IS03, IS07, IS09, IS14, IS15, IS17, IS18, IS19, IS24, EG01, EG02, EG03, F1 EG01/EG02, F1 IS03/IS17, F1 IS07/IS19, F1 IS07/IS18, F1 IS09/IS18, F1 IS18/IS24 e CS1 foram cultivados sobre

papel celofane, em placas de Petri com meio MBC. O micélio foi fixado em metanol por 3 minutos, em seguida, hidrolizado com HCl 1N a 60°C, por 10 minutos. Imediatamente após, o material foi lavado cuidadosamente em água destilada e em tampão fosfato 0,05M, pH 6,8. Após a lavagem, o micélio foi imerso no corante Giemsa diluído a 3% em tampão fosfato 0,05M pH 6,8 por, pelo menos, 2 horas.

Após a coloração do micélio, uma lâmina foi montada para cada isolado e, para cada lâmina, foram avaliados 30 campos e, em cada campo, um comprimento de hifa e ou uma região apical da hifa, sendo avaliadas cerca de 600 células. A avaliação consistiu em contar o número de núcleos nos compartimentos celulares, onde foi possível visualizar os dois septos que delimitavam o compartimento interno, determinado-se o número médio de núcleos por compartimento celular.

Os núcleos foram contados em um microscópio de luz Carl-Zeiss Amplitval, utilizando-se objetiva de 100X.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da produtividade do isolado CS1 preservado sob diferentes condições

Para o sucesso na produção de cogumelos, bem como para a realização do melhoramento genético, a manutenção de culturas puras e a produção de inoculantes de confiança são de suma importância. Visando suprir esta necessidade, foram desenvolvidas por Maia (2004) uma metodologia de preservação para culturas puras de *Agaricus blazei*. Contudo, na ocasião não foi avaliado se as diferentes condições de preservação provocariam mudanças fisiológicas afetando a produtividade das culturas. Para a condução dos estudos genéticos, a preservação de culturas monospóricas e resultantes de cruzamento é essencial para a manutenção de uma coleção sem perder características genéticas, em especial a produtividade.

No presente estudo, culturas preservadas por um período de 17 meses foram reativadas, em meio MBC a 28°C, avaliando-se primeiro o crescimento micelial em comparação à cultura isolada CS1 mantida regularmente no laboratório (controle). Não foi encontrada diferença significativa, a 5% de significância, pelo teste de médias Scott-Knott.

**TABELA 4** Avaliação do crescimento micelial de *A. blazei* preservado em diferentes substratos a 10 °C por 17 meses (\*valores médios do crescimento micelial em mm/dia)

Tratamentos	Substrato de preservação	Substrato de reativação	Média do crescimento micelial em mm/dia
1	Composto	BDA	2,80 a
2	Composto	Arroz em casca + Farelo de trigo	2,80 a
3	Solo	BDA	3,00 a
4	Solo	Arroz + Farelo de trigo	3,20a
5	Controle CS1	BDA	3,80 a

\* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Em uma segunda etapa, foi avaliada a produtividade das culturas de *A. blazei* preservadas em diferentes condições em relação à cultura controle presente no laboratório (Tabela 5). Também não se verificou diferença significativa entre os tratamentos, os quais variaram de 11,8% a 13,6% de produtividade, considerando a produção de cogumelos frescos por massa de composto úmido. Esses valores estão dentro dos níveis aceitáveis para uma produção economicamente viável.

**TABELA 5** Avaliação da produtividade de *A. blazei* preservado de diferentes condições (\*valores médios da produção de basidiocarpo em gramas de cogumelo fresco/5 kg de composto)

Tratamentos	Produtividade (gramas de cogumelo fresco por 5 kg de composto)
Solo	693,8 a
Controle CS1	712,1 a
Composto	713,5 a
Composto	721,5 a
Solo	758,3 a

\* Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### **4.2 Avaliação da produtividade de culturas repicadas do isolado CS1**

Outro aspecto abordado foi avaliar a produtividade de culturas de *A. blazei* obtidas em diferentes períodos de repicagem. Para isso, foram preparadas inoculantes para cada um dos tratamentos e, em seguida, inoculadas em composto. O composto foi induzido e o resultado da produção, em gramas, de cogumelo fresco por 5 kg de composto está demonstrado na Tabela 6.

As diferenças entre os resultados não foram significativas ao nível de 5% de probabilidade.

Segundos os resultados obtidos, o processo de repicagens sucessivas não influenciou na produtividade do basidiomiceto *A. blazei*.

Isso significa que isolados ou linhagens pertencentes a uma coleção podem ser mantidas no laboratório, sem necessidade de reisolamento, por pelo menos um ano, sem perder o potencial de produtividade.

**TABELA 6** Produtividade de culturas de *Agaricus blazei* obtidas a partir de diferentes períodos de repicagem.

Tratamentos	Produção (g de cogumelo fresco/5kg de composto úmido) *
CS1R1	712,1 a
CS1R3	778,3 a
CS1R2	788,0 a

\* Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

CS1R1 → Isolado CS1 repicado no laboratório desde 1998.

CS1R2 → Isolado CS1 repicado no laboratório por 10 vezes, a cada 30 dias.

CS1R3 → Isolado CS1 repicado apenas uma vez.

#### **4.3 Germinação de basidiósporos de *Agaricus blazei* para a obtenção de culturas monospóricas**

Inicialmente, os antibióticos ampicilina e cloranfenicol e o fungicida nistatina foram utilizados, nos experimentos de germinação de basidiocarpos, como agentes antimicrobianos para evitar a contaminação do meio por bactérias e leveduras. Porém, observou-se que estas substâncias afetavam a taxa e o tempo de germinação dos esporos. Sendo assim, foi conduzido um experimento para confirmar estas observações, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Os resultados demonstraram que o antibiótico cloranfenicol preparado em álcool 92,8°GL foi mais efetivo, na indução da germinação, dos basidiósporos em relação ao controle (MBC) sem antibiótico. As colônias apareceram após 10 dias de incubação à temperatura ambiente (23,5°C), enquanto que, no controle, o surgimento de colônias se deu apenas a partir de 14 dias.

Outro dado importante, também demonstrado na Tabela 7, é que o antibiótico ampicilina (50 mg/ml) apresenta uma boa capacidade de indução da germinação de basidiósporos de *A. blazei*, quando comparado com o controle (MBC), tendo ocorrido o surgimento das colônias após 10 dias de incubação à temperatura ambiente (23°C). Contudo, quando se utilizou a combinação de qualquer dos antimicrobianos, foi observado um decréscimo na taxa de germinação em relação aos resultados obtidos quando se utilizou ampicilina ou cloranfenicol, isoladamente.

A taxa de germinação de basidiósporos em meio sem antimicrobianos, que foi utilizado como controle, foi inferior à taxa apresentada quando os antibióticos ampicilina ou cloranfenicol estavam presentes. Além disso, o tempo necessário para o surgimento das colônias foi de 14 dias no meio controle MBC, confirmando o efeito estimulatório desses antibióticos sobre a germinação dos esporos.

O fungicida nistatina, isoladamente ou em combinação com cloranfenicol ou ampicilina, apresentou resultados estatisticamente iguais ao controle, ou seja, não apresentou um efeito estimulante da germinação. É importante ressaltar que as colônias surgiram após 29 dias de incubação à temperatura ambiente (23,5 °C), enquanto que, com cloranfenicol, esse tempo foi de apenas 10 dias.

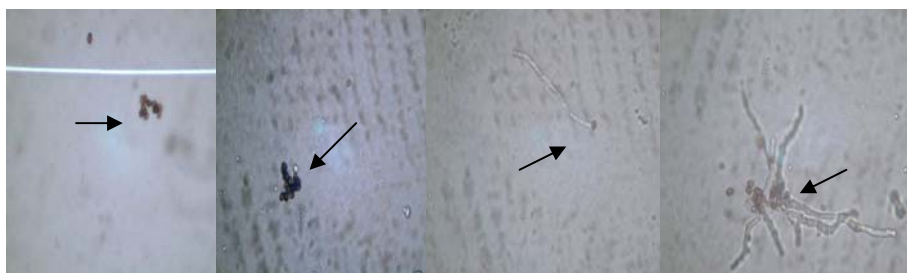


Esses resultados mostram que o cloranfenicol, além de atuar na prevenção de contaminantes bacterianos, pode estimular a taxa de germinação de basidiósporos de *A. blazei*. No entanto, esse efeito parece ser anulado pela presença de nistatina na concentração utilizada, apesar de não inibir o crescimento micelial do fungo, parece ter um efeito inibitório sobre a germinação dos basidiósporos.

**TABELA 7** Taxa de germinação de *A. blazei* em meio MBC, na presença de diferentes antibióticos ou de fungicida, utilizando uma concentração de  $2,6 \times 10^3$  esporos por placa.

Antibiótico e ou fungicida	Porcentagem de germinação
Nistatina	0,13 % a
Cloranfenicol, nistatina	0,11 % a
Ampicilina, nistatina	0,20 % a
Controle	0,23 % a
Ampicilina, cloranfenicol, nistatina	0,44 % b
Ampicilina e cloranfenicol	0,60 % b
Ampicilina	1,30 % c
Cloranfenicol	2,10 % d

\* Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



**FIGURA 1** Várias fases da germinação de basidiósporos de *Agaricus blazei* em meio MBC acrescido de micronutrientes e os antibióticos ampicilina e cloranfenicol.

Além dos antimicrobianos, foi avaliado também o efeito do meio de cultivo sobre a taxa de germinação dos basidiósporos, sendo testados dois meios: Ágar Composto e MBC.

Esperava-se que o meio Agar Composto pudesse favorecer uma maior taxa de germinação dos basidiósporos devido à sua maior complexidade. Porém, isso não aconteceu, não tendo sido encontradas diferenças significativas no que diz respeito à taxa e ao tempo de germinação dos esporos (Tabela 8). Neste mesmo experimento, avaliou-se também o efeito do álcool puro, além do cloranfenicol, sobre os dois meios testados. O objetivo era verificar se o efeito estimulador da germinação era propriamente do cloranfenicol ou do álcool utilizado para a sua solubilização. Os resultados mostram que há, na verdade, um efeito dos dois agentes.

Na literatura há relatos da utilização de várias substâncias como indutoras da germinação de esporos fúngicos, como, por exemplo, ácido isovalérico, ácido abiótico e diversos compostos voláteis (Kerrigan, 1994; Bonello, 1998; French, 1992). Contudo, não existem relatos na literatura sobre a indução da germinação de esporos de fungos por antibióticos. Os dados obtidos são úteis como sendo o primeiro relato de indução da germinação de esporos de fungos por antibióticos. Porém, neste trabalho não foi determinada a ação fisiológica destes antibióticos no processo germinativo.

Estes resultados serão úteis na obtenção de culturas monospóricas de *A. blazei* para futuros estudos de cruzamentos entre diferentes linhagens da espécie.

**TABELA 8** Taxa de germinação de esporos de *A. blazei* em dois meios de cultura contendo cloranfenicol ou álcool.

Tratamento	Meio	Antibiótico e ou álcool	Porcentagem de germinação
10	MBC	Álcool	1,0 % a
12	Composto	Álcool	1,1 % a
11	Composto	Cloranfenicol	2,0 % b
09	MBC	Cloranfenicol	2,1 % b

\* Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### **4.4 Avaliação das culturas monospóricas de *A. blazei***

Foram avaliados três aspectos em relação às culturas monospóricas de *A. blazei*: cruzamento entre as culturas monospóricas, crescimento micelial em meio MBC e crescimento micelial em composto.

Estas avaliações são indicadas por Kerrigan et al. (1992, 1994) para auxiliarem na determinação de isolados homocariotos, que são importantes na realização do melhoramento genético.

Os resultados dos cruzamentos são caracterizados pela formação de micélio penuginoso aéreo na linha de junção entre duas culturas homocariotas ou uma linha com característica micelial diferente na junção das duas culturas (Figura 2).

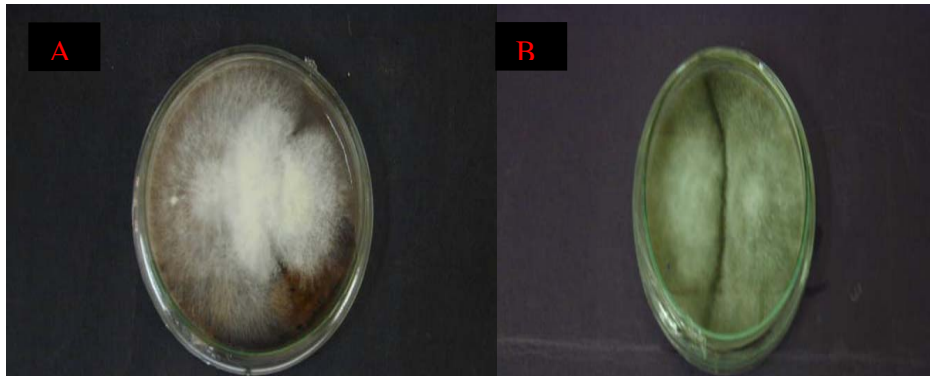


FIGURA 2 Resultado de cruzamento de culturas monospóricas de *Agaricus blazei*. A: cruzamento positivo entre as culturas monospóricas IS09 e IS18. B: cruzamento negativo entre as culturas IS02 e IS19.

Ocorreram cruzamentos entre algumas das culturas monospóricas, indicando que elas podem apresentar “mating type” diferentes e serem monocarióticas. Kües (2000) e Kronstad & Staben (1997) relatam a ocorrência de cruzamentos isolados de *Coprinus cinereus*, que apresentam um dos “mating type” igual.

Kerrigan (2005) comparou isolados de *A. blazei* oriundos do Brasil com um isolado de *A. subrufescens* e concluiu que na verdade as duas são a mesma espécie e, neste caso, a espécie possui ciclo de vida sexual anfitálico, ou seja, trata-se de uma espécie que pode apresentar comportamento heterotálico e pseudo-homotálico, conforme também ocorre com o *A. bisporus* (Callac et al., 1998).

Labory (2003) constatou que o *A. blazei* CS1 produz basídios com 4 basidiósporos, no entanto, não definiu se os núcleos são idênticos ou não. Para isso, seria necessário determinar se a divisão pós-meiótica, que dá origem a 8 núcleos, ocorre antes ou depois da migração dos núcleos para os basidiósporos. Caso a divisão ocorra após a migração,

os basidiósporos seriam obrigatoriamente homocarióticos, caso contrário, diferentes combinações poderiam ocorrer, com grande probabilidade de serem formados basidiósporos heterotálicos e homotálicos.

Os resultados de cruzamentos indicam que o isolado CS1 de *A. blazei* apresenta ciclo sexual com características anfitálica, visto que tanto culturas monospóricas quanto originadas de cruzamento foram férteis.

A avaliação da fertilidade dos isolados é uma importante ferramenta para auxiliar no esclarecimento destas dúvidas. Devido a isso, foram produzidos inoculantes das culturas monospóricas e das oriundas do cruzamento entre as mesmas, os quais foram inoculados em composto visando à indução da frutificação. Resultados parciais mostraram que apenas o isolado CS1, as culturas F1 IS03/IS17 e F1 EG01/EG02 e as culturas monospóricas IS02, IS03, IS07, IS17, IS19 frutificaram. Segundo Callac et al. (1998), de 16 culturas monospóricas monocarióticas de *A. bisporus* testadas, 9 frutificaram, ainda que tenham sido pobres e tardias.

#### **4.5 Avaliação do crescimento micelial das culturas de *A. blazei***

Os resultados do crescimento micelial em meio MBC das culturas monospóricas estão representados na Tabela 9.

A taxa de crescimento é um item importante na determinação de culturas monocariotas, as quais apresentam menor taxa de crescimento em relação a culturas dicariotas. Segundo os resultados das médias de crescimento micelial em meio MBC, a cultura EG3 apresentou o menor crescimento micelial dentre as culturas avaliadas. As culturas IS2, IS3, IS7, IS9, IS14, IS15, IS17, IS19, IS24 e EG1 apresentaram também um

menor crescimento micelial quando comparadas com o controle CS1. Contudo, as culturas originadas de cruzamento F1 IS03/IS17, F1 EG1/EG3, F1 IS09/IS18 e F1 IS07/IS18 apresentaram também uma baixo crescimento micelial. Apenas duas culturas resultantes de cruzamento apresentaram crescimento micelial equivalente ao isolado CS1. Além disso, uma cultura monospórica, obtida por micromanipulação (EG2) também apresentou crescimento micelial equivalente ao CS1.

Essa variação no comportamento das culturas pode ser mais uma indicação da complexidade do ciclo sexual deste fungo, fugindo do padrão dicarioto clássico. No caso das culturas monospóricas EG1, EG2 e EG3 (obtidas por micromanipulação), os valores foram completamente distintos, indicando que podem ter ocorrido diferentes combinações de núcleos, uma vez que os basidiósporos de *A. blazei* são binucleados.

**TABELA 9** Avaliação do crescimento micelial de culturas monospóricas e culturas resultantes de cruzamento de *A. blazei* em meio MBC (\* valores médios do diâmetro de crescimento micelial em mm/dia)

Tratamentos	Médias *
EG 03	0,80 a
F1 IS03/IS17	1,40 b
IS14	1,40 b
F1 EG1/EG2	1,60 b
IS24	1,80 c
IS03	2,00 c
IS09	2,00 c
IS07	2,00 c
IS17	2,00 c
IS19	2,00 c
IS15	2,00 c
F1 IS09/IS18	2,00 c
IS18	2,20 c
F1 IS07/IS18	2,20 c
EG1	2,20 c
IS2	2,20 c
F1 IS18/24	2,60 d
F1 IS07/19	2,80 d
Controle CS1	3,00 d
EG2	3,00 d

\* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Foi avaliado o crescimento micelial das culturas monospóricas de *A. blazei* também em composto de cultivo, devido ao fato de este ser um importante passo para se produzir basidiocarpos e, conseqüentemente, determinar a fertilidade dos isolados e das culturas originadas dos cruzamentos.

A cultura EG3 apresentou também um baixo crescimento micelial em composto, sendo importante observar, no preparo dos inoculantes, que ela apresentou também crescimento mais lento que as demais culturas. Este fato corrobora com os demais já apresentados, indicando tratar-se possivelmente, se trata de uma cultura homocariótica. As culturas IS07 e IS09 também apresentaram um lento crescimento no composto, sendo seguidas por um grande grupo intermediário com 9 culturas monospóricas e 2 “resultantes de cruzamento”.

O último grupo de melhor crescimento micelial no composto, apresentou, além do controle fértil (CS1), 4 culturas “resultantes de cruzamento” e uma cultura monospórica obtida por micromanipulação. O fato de essa cultura monospórica apresentar o mesmo vigor do isolado CS1 pode ser um indicativo de que o esporo que deu origem à mesma seja heterocariótica.



**TABELA 10** Avaliação do crescimento micelial de culturas monospóricas e culturas resultantes de cruzamento de *A. blazei* em composto (\* valores médios do diâmetro de crescimento micelial em mm/dia)

Tratamentos	Médias *
EG03	2,22 a
IS07	4,14 a
IS09	4,44 a
IS14	5,66 b
IS24	5,82 b
IS19	5,86 b
IS17	5,90 b
F1 IS07/IS19	6,16 b
IS15	6,18 b
IS02	6,76 b
F1 IS07/IS18	6,76 b
EG2	6,82 b
IS18	6,98 b
IS3	7,66 b
F1 IS18/IS24	8,10 c
F1 EG1/EG2	9,98 c
F1 09/18	10,26 c
PADRÃO CS1	10,58 c
EG1	10,76 c
F1 IS03/IS17	10,96 c

\* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.6 Avaliação citológica de hifas

A técnica de coloração de Giemsa propiciou uma boa visualização de núcleos e septos das culturas monospóricas de *A. blazei*, bem como das culturas originadas de cruzamentos e da cultura controle CS1.

Embora a média e a moda do número de núcleos tenham variado entre as hifas dos isolados (Tabela 11), as mesmas estão de acordo com a variação encontrada por Labory et al. (2003), que encontraram de 6 a 8 núcleos no isolado CS1 que, neste trabalho, foi adotado como controle (Figura 3).

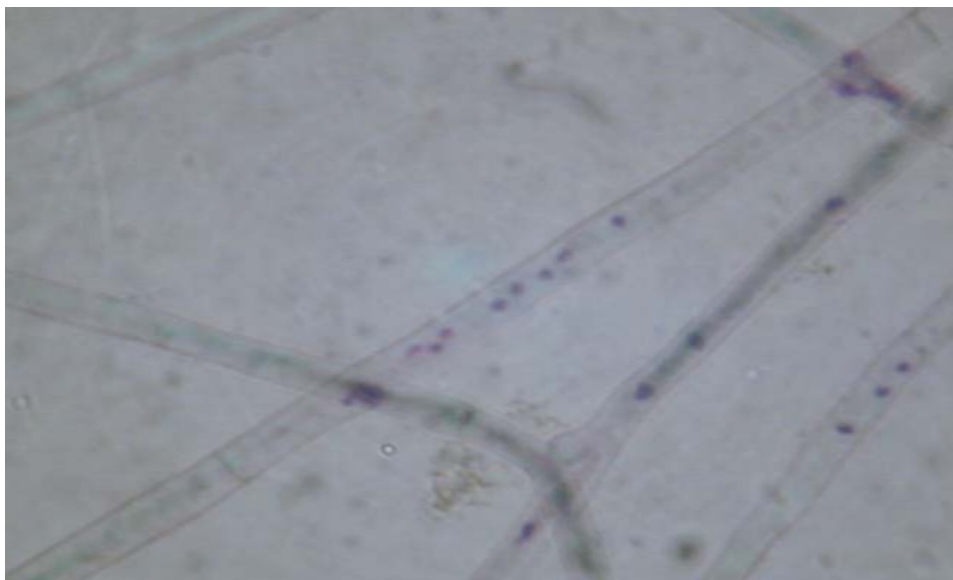


FIGURA 3 Hifas multinucleadas de *A. blazei*. Coloração Giemsa (objetiva de 100X)

**TABELA 11** Média do número de núcleos das hifas de *A.blazei*

Tratamentos	Médias	Moda
CS1	7,06	7,00
IS02	6,26	7,00
IS03	6,00	6,00
IS07	7,06	7,00
IS14	6,66	7,00
IS15	6,40	6,00
IS17	5,73	5,00
IS19	7,20	7,00
EG01	6,26	7,00
EG02	6,53	7,00
F1 IS07/IS19	6,73	7,00
F1 IS07/IS18	6,66	7,00
F1 IS09/IS18	7,06	7,00

A coloração de núcleos revelou, ainda, que os ápices das hifas apresentaram de 2 a 3 núcleos por compartimento (Figura 4), tendo o isolado CS1 apresentado em média, 3 núcleos em cada compartimento distal das suas hifas. Esses resultados mostram que, mesmo nas culturas monospóricas, apenas os compartimentos distais tendem a manter apenas dois núcleos, independentemente de a cultura sofrer cruzamento ou não.

Por meio da técnica de coloração de Giemsa, foi possível observar a formação de grampos de conexão nos isolados EG03 e F1 EG01/EG03, porém, tratou-se de um fenômeno raro (Figura 5). Foi

observada também a formação de anastomose entre hifas dos isolados EG03, F1 EG01/EG02, F1 IS18/IS24 e F1 IS09/IS18, além do isolado CS1 (Figura 6). Segundo Kües (2000), mesmo em culturas férteis de basidiomicetos dicariotos, é possível ocorrer anastomose com outras culturas, porém, o dicarioto não permite a invasão de novos núcleos. Porém, caso o dicarioto cruze com um monocarioto, é possível que este receba núcleos da cultura dicariota, produzindo um ou dois novos micélios dicariotos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram não haver um padrão diferenciado entre culturas monospóricas e de cruzamentos positivos de *A. blazei*. Isso parece indicar que, nos basidiósporos binucleados formados, ocorrem diferentes combinações, podendo ocorrer formação de basidiósporos homocarióticos e heterocarióticos. Entretanto, novos experimentos deverão ser conduzidos com o objetivo de se obter novas culturas monospóricas para indução da frutificação de um número maior de culturas. Além disso, essas culturas deverão ser avaliadas quanto à produtividade e quanto ao tempo de frutificação.

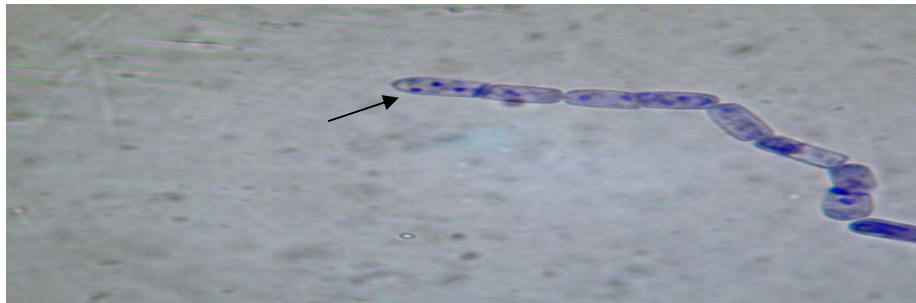


FIGURA 4 Ápice de hifas com três núcleos de *A. blazei*. Coloração Giemsa (objetiva de 100X)

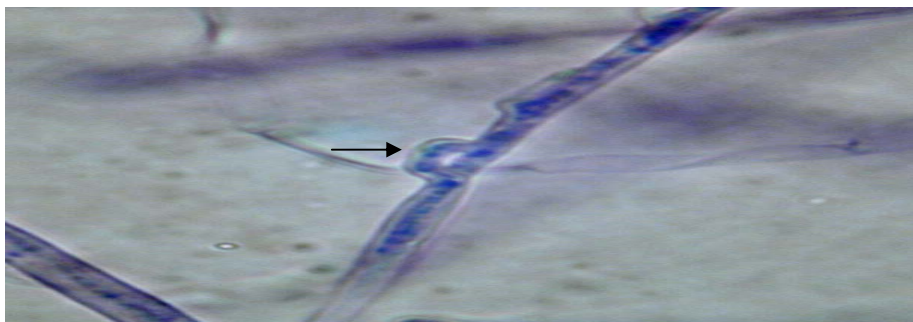


FIGURA 5 Grampo de conexão encontrado na cultura de *A. blazei* F1 EG01/EG02

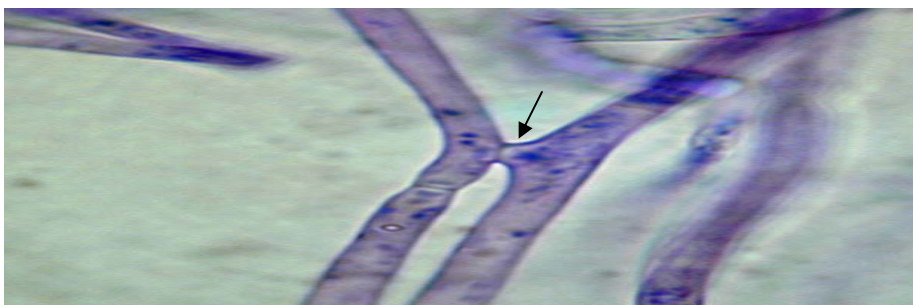


FIGURA 6 Anastomose encontrada na cultura de *A. blazei* F1 EG01/EG02

**TABELA 12** Avaliação do número de núcleos do ápice de hifas de *A. blazei*

Tratamentos	Médias	Moda
CS1	3,00	3,00
IS02	2,10	2,00
IS03	3,00	3,00
IS07	2,76	2,00
IS09	2,50	2,00
IS14	2,50	2,00
IS15	2,06	2,00
IS17	2,46	2,00
IS19	2,83	2,00
IS24	2,36	2,00
EG01	2,80	3,00
EG02	2,80	3,00
EG03	2,73	3,00
F1 IS07/IS19	2,90	3,00
F1 IS07/IS18	2,26	2,00
F1 IS09/IS18	2,83	3,00
F1 IS18/IS24	2,40	2,00

## 5 CONCLUSÕES

Culturas preservadas a 10°C por 17 meses não perderam sua capacidade de frutificação.

Os antibióticos ampicilina e cloranfenicol mostraram-se efetivos no aumento da taxa de germinação de basidiósporos de *Agaricus blazei*.

Apenas 10% dos cruzamentos entre as culturas monospóricas foi positivo, mostrando incompatibilidade entre a maioria das culturas.

Tanto culturas de cruzamento positivo como culturas monospóricas foram capazes de frutificar.

Não foi possível estabelecer um padrão distinto entre culturas monospóricas e cruzamentos positivos, com base tanto no crescimento micelial como no padrão nuclear.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONELLO, P. et al. Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. **New Phytologist**, v. 138, p. 533-542, 1998.
- CALLAC, P. et al. Bsn-t alleles from french field strains of *Agaricus bisporus*. **Applied and environmental microbiology**, v.64, n.6, 1998.
- CARLILE, J.M et al. **The Fungi**. 1.ed. San Diego: Academic Press INC, 1994. 482p.
- CAMARGO JÚNIOR, O.A. **Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f. sp. *Phaseoli* por meio de marcadores RAPD**. 2004. 60 p. Dissertação –(Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CHANG, S.T.; HAYES, W.A. **The biology and cultivation of edible mushrooms** New York, Academic, 1978. 819p.
- EIRA, A.F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (wasser et al.)**. 1.ed. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2003. p. 398.
- DIAS, E.S. et al. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.61, n.5 sept./oct. 2004.
- FIERRO, F., MARTIN, J.F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 1999.
- FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycological Society of America**. p. 277-287, 1992.
- JAMES, R.R.; BUCKNER, J.S. Lipids stimulate spore germination in the entomopathogenic ascomycete *Ascospaera aggregata*. **Mycopathologia**. Netherlands, v.158, p.293-302, 2004.
- KERRIGAN, R.W. et al. Strategies for the efficient recovery of *Agaricus bisporus* homokaryons. **Mycologia**. New York, v.84, n.4, p.575-579, 1992.



KERRIGAN, R.W. et al. The heterothallic life cycle of *Agaricus bisporus* var. *burnettii* and the inheritance of its tetrasporic trait. **Experimental Mycology**. v.18, p.193-210, 1994.

KERRIGAN, R.W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom and its synonyms. **Mycologia**. New York, v.97, n.1, p.12-24, 2005.

KRONSTAD, J.W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Reviews of Genetics**. v.31, p.245-276, 1997.

KÜES, U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.64, n.2, p.316-353, 2000.

LABORY, C.R.G. et al. Coloração de núcleos de esporos e hifas de cogumelo *Agaricus blazei*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.27, n.2, p.471-474, 2003.

LABORY, C.R.G. **Avaliação citológica e condições de crescimento de *Agaricus blazei***. 2003. 60 p. Tese – (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MAGNÉ, M.B. et al. Characterization of cultivated strains of a new edible mushroom: *Stropharia rugoso-annulata*. II. Anatomy, mycelium development and frutification. **Académie Des Sciences**. Elsevier, v.320, p.917-924, 1997.

MAIA, S.C. **Efeitos de substratos e temperatura na preservação de *Agaricus blazei***. 2004. 58 p. Dissertação – (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROANE, C.W. A method of preparing fungi for cytological studies. **Phytopathology**, Saint Paul, v.42, p.480, 1952. Abstract.

URBEN, A.F. et al. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 151p.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Y.; AMAZONAS, M.A.L.A.; NEVO, E.; STAMES, P.; EIRA, A.F. IS a widely cultivated culinary-medicinal mushroom indeed *Agaricus blazei* Murril? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.4, n.4, p.267-290, 2002.

## ANEXO

Anexo		Página
Tabela 1	Análise de variância do crescimento micelial de <i>A. blazei</i> preservado em diferentes substratos, a 10°C, por 17 meses.	49
Tabela 2	Análise de variância da produtividade de <i>A. blazei</i> preservado de diferentes condições.	49
Tabela 3	Análise de variância da produtividade das culturas de <i>A. blazei</i> obtidas a partir de diferentes períodos de repicagem.	49
Tabela 4	Análise de variância de <i>A. blazei</i> em meio MBC, na presença de diferentes antibióticos ou de fungicida utilizando uma concentração de $2,6 \times 10^3$ esporos por placa.	50
Tabela 5	Análise de variância da taxa de germinação de esporos de <i>A. blazei</i> em dois meios de cultura contendo cloranfenicol ou álcool.	50
Tabela 6	Análise de variância do crescimento de culturas monospóricas e culturas resultantes de cruzamento de <i>A. blazei</i> em meio MBC.	50
Tabela 7	Análise de variância do crescimento de culturas monospóricas e culturas resultantes de cruzamento de <i>A. blazei</i> em composto.	51

TABELA 1 Análise de variância do crescimento micelial de *A. blazei* preservado em diferentes substratos a 10 °C por 17 meses.

Varição	GL	SQ	QM	F	Prob.
Linhagens	4	3,4400	0,8600	2,3890	0,0852
Resíduo	20	7,2000	0,3600		
Total	24	10,6400			
CV	19,23				

GL - Graus de Liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio; F - calculado; Prob. - Probabilidade

TABELA 2 Análise de variância da produtividade de *A. blazei* preservado de diferentes condições.

Varição	GL	SQ	QM	F	Prob.
Linhagens	4	22601,1200	5650,2800	0,177	0,9491
Resíduo	45	1436251,6000	31916,7022		
		0			
Total	49	1458852,7200			
		0			
CV	24,82				

GL - Graus de Liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio; F - calculado; Prob. - Probabilidade

TABELA 3 Análise de variância da produtividade das culturas de *A. blazei* obtidas a partir de diferentes períodos de repicagem.

Varição	GL	SQ	QM	F	Prob.
Linhagens	2	34124,4666	17062,2333	0,332	0,7204
Resíduo	27	1387715,0000	51396,851852		
Total	29	1421839,4666			
CV	29,85				

GL - Graus de Liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio; F - calculado; Prob. - Probabilidade

TABELA 4 Análise de variância de *A. blazei* em meio MBC na presença de diferentes antibióticos ou de fungicida utilizando uma concentração de  $2,6 \times 10^3$  esporos por placa.

Varição	GL	SQ	QM	F	Prob.
Tratamentos	7	42,3875	6,0553	45,8930	0,00
Resíduo	72	9,5000	0,1319		
Total	79	51,8875			
CV	67,58				

GL - Graus de Liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio; F - calculado; Prob. - Probabilidade

TABELA 5 Análise de variância da taxa de germinação de esporos de *A. blazei* em dois meios de cultura contendo cloranfenicol ou álcool.

Varição	GL	SQ	QM	F	Prob.
Tratamentos	3	10,1000	3,3666	20,8970	0,00
Resíduo	36	5,8000	0,1611		
Total	39	15,9000			
CV	25,90				

GL - Graus de Liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio; F - calculado; Prob. - Probabilidade

TABELA 6 Análise de variância do crescimento de culturas monospóricas e culturas resultantes de cruzamento de *A. blazei* em meio MBC.

Varição	GL	SQ	QM	F	Prob.
Linhagens	19	27,2400	1,4336	6,994	0,00
Resíduo	80	16,4000	0,2050		
Total	99	43,6400			
CV	21,98				

GL - Graus de Liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio; F - calculado; Prob. - Probabilidade

TABELA 7 Análise de variância do crescimento de culturas monospóricas e culturas resultantes de cruzamento de *A.blazei* em composto.

Varição	GL	SQ	QM	F	Prob.
Linhagens	19	54197,2000	2852,4842	8,7660	0,0000
Resíduo	80	26032,8000	325,4100		
Total	99	80230,0000			
CV	25,41				

GL - Graus de Liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio; F - calculado; Prob. - Probabilidade