

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
ISOLADOS DE *Agaricus blazei*  
BASEADA EM MARCADORES  
RAPD E PCR-RFLP**

**MÁRCIA MAYUMI TOMIZAWA**

**2005**

MÁRCIA MAYUMI TOMIZAWA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Agaricus blazei*  
BASEADA EM MARCADORES RAPD E PCR-RFLP**

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  
2005**

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

Tomizawa, Márcia Mayumi

Variabilidade genética de isolados de *Agaricus blazei* baseada em marcadores RAPD e PCR-RFLP / Márcia Mayumi Tomizawa. -- Lavras : UFLA, 2005.

92 p. : il.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Variabilidade genética. 2. Marcador molecular. 3. RAPD. 4. PCR-RFLP.  
5. Cogumelo. ~~6. *Agaricus blazei*~~. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.8

**MÁRCIA MAYUMI TOMIZAWA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Agaricus blazei*  
BASEADA EM MARCADORES RAPD E PCR-RFLP**

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 10 de agosto de 2005**

**Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho**

**DCF/UFLA**

**Prof. Dr. João Bosco dos Santos**

**DBI/UFLA**

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

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2005**

## DEDICATÓRIA

*Aqueles que, mesmo distantes, nunca me abandonaram...*

*Sempre me incentivaram... Sempre acreditaram...*

*Aqueles que compartilharam... Choraram...*

*E viram este sonho se realizar!*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso maior Mestre, por toda força e luz em meu caminho e por me fazer acreditar que eu nunca estive só em nenhum momento da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e formação profissional.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPEMIG - Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, pelo financiamento do projeto.

Ao professor Eustáquio Souza Dias, pela orientação e incentivo sempre constante, pelas críticas e sugestões, pela paciência e disposição durante a realização deste trabalho e por sempre acreditar na minha capacidade.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela disponibilidade, atenção, ensinamentos e também à professora Dulcinéia de Carvalho, pelas valiosas sugestões e contribuições neste trabalho.

Aos professores Romildo da Silva e Rosane Freitas Schawn, pelos ensinamentos, pela amizade, atenção e disponibilidade.

À professora Sui Mui Tsai, por ter permitido a realização de uma parte importante deste trabalho e à equipe do Laboratório de Seqüenciamento e Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP), em especial ao José Elias Gomes, à Fabiana e ao Ednilson, por toda ajuda prestada.

Ao Laboratório de Genética Molecular (DBI/UFLA), em especial ao Lamartine, por toda ajuda, atenção, paciência e amizade.

Aos alunos de iniciação científica, Leandro e Plínio, por toda ajuda, esforço e dedicação neste trabalho.

À minha família, pela confiança, pelos conselhos, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao Toyo, pela sua compreensão, por todo seu amor e carinho.

À querida amiga Luana Botelho e à sua família, pelo acolhimento, por toda amizade, carinho e atenção.

À grande amiga Cláudia Labory e seu marido João Cândido, pelas lições de vida e amizade sempre sincera e ao seu filhinho Vinícius, pelas alegrias.

Ao amigo Pascoal, pela alegria e descontração, amizade e ensinamentos durante a minha iniciação científica.

Às amigas Sayonara, Beth, Valdirene e Evânia, pelo apoio e amizade.

À querida Cidinha, por toda atenção, carinho e amizade.

À Magda e a Ivani, por toda disponibilidade, ajuda, amizade e atenção.

Ao casal Débora e João Borges, pela amizade e excelente convivência durante o curso.

À Adrianinha (DCS), pela disponibilidade e ajuda durante as análises.

Aos colegas e ex-colegas de pós-graduação: Félix, Miriam, Marisa, Márcio, Euziclei, Gisele, Thaís, Lucas, Nina, Sandra, Patrícia, Rômulo, Cláudia Nogueira, Helson, Jaíne, Vítor, Carla, Halan, Claudinelli, Aramália, Fernanda, Scheila, Alexandre, Éderson, Cláudia Eugênia, Cris, Luiz, Renil, Cássia e Sílvia, pela troca de experiências, convívio e amizade.

Aos alunos bolsistas de iniciação científica, estagiários e funcionários do Laboratório de Microbiologia: Whasley, Grazi, Gabi, Caio, Ana Paula, Danielle, Emerson, Leidiane, Léo, Patrícia, Claudinha, Luziane, Milena, Fábio e ao eterno e inesquecível amigo Vinícius (*in memoriam*), pelo convívio e amizade

Ao Laboratório de Citogenética (DBI/UFLA), ao Laboratório de Fisiologia Vegetal (DBI/UFLA) e ao Laboratório de Melhoramento Florestal (DCF/UFLA), que tiveram, de alguma forma, fundamental participação e importância na realização deste trabalho.

Aos funcionários do DBI, em especial à Zélia, Rafaela, Elaine e Iro.

A todos, a minha eterna gratidão!

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1 O cogumelo <i>Agaricus blazei</i> .....	03
2.2 Histórico e as novas propostas para a re-classificação da espécie.....	04
2.3 Importância.....	05
2.4 Produção de <i>Agaricus blazei</i> .....	06
2.5 Produção de inoculantes.....	08
2.6 Possíveis fontes de variabilidade em fungos.....	10
2.7 Uso de marcadores moleculares.....	11
2.7.1 RAPD.....	12
2.7.2 RFLP.....	17
2.7.3 DNA mitocondrial (mtDNA).....	18
2.7.4 DNA ribossomal (rDNA).....	19
2.7.5 PCR-RFLP.....	22
2.7.6 PFGE.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Isolados.....	27
3.2 Meio de cultivo.....	28
3.3 Obtenção do micélio utilizado para extração do DNA.....	29
3.4 Extração do DNA total.....	29
3.5 Análise da variabilidade genética de <i>A. blazei</i> por RAPD, PCR-RFLP do rDNA e seqüenciamento de regiões do rDNA.....	31



3.5.1	Análise da variabilidade por RAPD.....	31
3.5.1.1	Análise dos dados.....	33
3.5.2	Análise da variabilidade por PCR-RFLP da região ITS do rDNA.....	33
3.5.2.1	Amplificação da região ITS por PCR.....	33
3.5.2.2	Precipitação dos produtos de PCR amplificados.....	34
3.5.2.3	Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição.....	34
3.5.3	Seqüenciamento de regiões do rDNA.....	35
3.5.3.1	Amplificação do DNA por PCR.....	35
3.5.3.2	Purificação dos fragmentos amplificados para seqüenciamento.....	36
3.5.3.3	Seqüenciamento dos fragmentos amplificados.....	37
3.5.3.4	Análise das seqüências.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Análise da variabilidade genética de isolados de <i>Agaricus blazei</i> por meio de marcadores RAPD.....	39
4.2	Análise do rDNA.....	54
5	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	ANEXOS.....	78

## RESUMO

TOMIZAWA, Márcia Mayumi. Variabilidade genética de isolados de *Agaricus blazei* baseada em marcadores RAPD e PCR-RFLP. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinem. é um cogumelo nativo do Brasil que vem despertando a atenção de vários pesquisadores em todo o mundo, devido às suas propriedades farmacológicas e nutricionais. Com o objetivo de se avaliar a variabilidade genética de alguns isolados utilizados comercialmente, duas técnicas moleculares foram empregadas: RAPD e PCR-RFLP da região ITS do rDNA. Foram analisados nove isolados de *A. blazei*, provenientes de diferentes regiões do país e dois isolados de *A. bisporus*, que serviram como controle. Estes isolados fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do DBI/UFLA. Para análise de RAPD, diferentes *primers* aleatórios foram utilizados, gerando um total de 445 bandas polimórficas. Procedeu-se a avaliação de similaridade genética entre os isolados pelo coeficiente de Dice e análise de agrupamento pelo método UPGMA. Os resultados revelaram que os isolados CS1, CS3, CS4, CS6, CS8 e CS9 de *A. blazei* apresentaram uma alta similaridade genética sendo considerados isolados de uma mesma origem ou clones. O isolado CS2 foi o mais divergente, seguido dos isolados CS5 e CS7, com médias de 60,6%, 88,7% e 91,3% de similaridade genética, respectivamente. A amplificação da região ITS do rDNA, utilizando os *primers* ITS1/ITS4, resultou em um único fragmento de aproximadamente 700 pb em todos os isolados analisados, os quais foram digeridos com diferentes enzimas de restrição para análise de RFLP. Os padrões de restrição obtidos com as enzimas *AluI* e *HindIII* revelaram o polimorfismo interespecífico da região ITS entre as duas espécies analisadas, também confirmadas por meio do seqüenciamento da mesma. Foi verificada, no isolado CS2, a ocorrência de uma possível mutação no sítio de restrição da enzima *HindIII*, dentro de algumas repetições da região ITS do seu rDNA. No entanto, pela técnica de PCR-RFLP, foi verificada a existência de um baixo polimorfismo intra-específico da região ITS na espécie *A. blazei*. Portanto, outras regiões que detectem maior polimorfismo devem ser analisadas, uma vez que a variabilidade genética da região ITS parece ser reduzida nesta espécie.

---

\*Comitê Orientador: Eustáquio Souza Dias - UFLA (Orientador), Rosane Freitas Schwan - UFLA e João Bosco dos Santos - UFLA.

## ABSTRACT

TOMIZAWA, Márcia Mayumi. Genetic variability of isolates of *Agaricus blazei* based in markers RAPD and PCR-RFLP. 2005. 92 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinem. is a Brazilian native mushroom which has called the attention of several researchers all over the world due to its nutritional and pharmacological properties. Aiming at evaluating the genetic variability of some isolates commercially utilized, two molecular techniques were applied: RAPD and PCR-RFLP of the rDNA ITS region. Nine isolates of *A. blazei* were analyzed, from different regions in the country, and two isolates of the mushroom *A. bisporus*, which served as control group. All of them are part of the collection of mushroom of the Edible and Medicinal Mushroom Laboratory of DBI/UFLA (Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do DBI/UFLA). For RAPD analysis, different random *primers* were used, generating 445 polymorphic bands. The genetic similarity was estimated between the isolates by means of Dice coefficient and grouping analysis through UPGMA method. The results showed that the isolates CS1, CS3, CS4, CS6, CS8 e CS9 of *A. blazei* showed high genetic similarity, and were considered isolates of the same origin or clones. The CS2, was the isolate which showed the higher genetic divergence in relation to the others (60,6%), followed by the CS5 (88,7%) and CS7 (91,3%). The amplification of the ITS region of rDNA, utilizing the ITS1/ITS4 *primers*, resulted in only one fragment of approximately 700 base pairs (bp) in all the analyzed isolates, which were digested with different restriction enzymes for the RFLP analysis. The restriction patterns, obtained with the enzymes *AluI* and *HindIII*, revealed the interspecific polymorphism of the ITS region between the two species, it was also confirmed through the sequencing of it. It was found on the isolate CS2, the occurrence of a possible mutation on the site of the enzyme *HindIII*, in some replications of the ITS region. However by means of the PCR-RFLP low intraespecific polymorphism of the ITS region was observed in *A. blazei*. Therefore, other regions which detect more polymorphism should be analyzed, once that the genetic variability of ITS region seems to be reduced in this species.

---

\*Guidance Comitee: Eustáquio Souza Dias - UFLA (Advisor), Rosane Freitas Schwan - UFLA and João Bosco dos Santos - UFLA.

# 1 INTRODUÇÃO

*Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann é um cogumelo nativo do Brasil que vem despertando a atenção de vários pesquisadores em todo o mundo, principalmente no Japão, na China, na Coréia, nos EUA e aqui no Brasil, devido às suas propriedades farmacológicas e nutricionais. Seus efeitos medicinais foram inicialmente estudados na Faculdade de Medicina da Universidade de Mie e na Universidade de Shizuoka, no Japão, onde descobriram suas propriedades anticancerígenas e seu potencial de ativar o sistema imunológico. Embora o conhecimento do efeito farmacológico das substâncias produzidas por *A. blazei* seja recente e testadas apenas em cobaias, o seu consumo, principalmente nos países orientais, vem crescendo a cada ano.

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de *A. blazei*, por ser uma espécie nativa, apresentando as condições climáticas favoráveis para o seu cultivo. A produção nacional atinge, por ano, 40 toneladas de cogumelo desidratado, sendo 95% da produção destinados à exportação para o mercado japonês.

Devido ao seu elevado preço no mercado internacional, muitas empresas e produtores rurais passaram a buscar nesse cogumelo uma nova alternativa de renda. Várias empresas ou cooperativas têm comercializado o inóculo (“semente” ou *spawn*) de *A. blazei* ou o próprio composto colonizado. No entanto, pouco se sabe a respeito da origem e da variabilidade genética dos isolados utilizados para a produção comercial de inóculo.

Visto que alguns produtores enfrentam problemas no cultivo desse cogumelo, é de fundamental importância que, além dos aspectos tecnológicos de produção, haja um estudo para avaliar se os diferentes isolados utilizados atualmente no mercado apresentam um mesmo padrão genético, o que será

importante para que o produtor tenha a segurança de estar adquirindo um material com inóculo de boa qualidade.

Além de permitir uma comparação entre os diferentes isolados, o uso de marcadores moleculares poderá ser importante futuramente, para se fazer uma correlação entre os mesmos e alguns parâmetros importantes relacionados às propriedades farmacológicas dos cogumelos como atividade antitumoral, antimutagênica e bactericida.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética de isolados do cogumelo *A. blazei*, provenientes de diferentes regiões do país, por meio de marcadores moleculares RAPD e PCR-RFLP do rDNA.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O cogumelo *Agaricus blazei*

O *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinem. é uma espécie de fungo filamentosos (macrofungo), pertencente ao Reino Fungi, Divisão Basidiomycota, Classe Hymenomycetes, Ordem Agaricales, Família Agaricaceae e Gênero *Agaricus* (Braga & Eira, 1997).

É um fungo saprófita que se desenvolve em clima tropical e úmido com temperatura variando entre 25°C a 30°C, de ocorrência natural nas regiões serranas da Mata Atlântica do estado de São Paulo. Foi encontrado pela primeira vez, em 1965, na cidade de Piedade, SP, por um agricultor e imigrante japonês chamado Takatoshi Furomoto (Braga et al., 1998; Eira, 2003). Na época da sua descoberta, algumas amostras foram enviadas para o Japão para que fossem estudadas suas propriedades medicinais. Devido às condições climáticas favoráveis ao cultivo deste cogumelo, matrizes reproduzidas no Japão foram enviadas de volta para o Brasil e, desde então, várias técnicas de produção têm sido adaptadas (Eira, 2003).

No Brasil, a espécie ficou conhecida popularmente como “cogumelo do sol”, pelo fato de crescer em campo aberto. No entanto, recebe várias outras denominações, como cogumelo piedade, em homenagem à cidade em que foi descoberto, cogumelo medicinal, cogumelo princesa, cogumelo de Deus, cogumelo da vida, cogumelo dos deuses (Mizuno, 1995) e, mais recentemente, champignon do Brasil (Amazonas & Siqueira, 2003). No Japão, ele é conhecido como himematsutake (Itoh et al., 1994) ou kawariharatake (Mizuno, 1995) e nos Estados Unidos, como royal agaricus, royal sun agaricus ou almond portobello.

## 2.2 Histórico e as novas propostas para a re-classificação da espécie

Na década de 1960, o agricultor e imigrante japonês Takatoshi Furomoto descobriu em sua propriedade, na região de Piedade, SP, um cogumelo diferente que chamou sua atenção. Não tendo conseguido identificá-lo, enviou amostras desse cogumelo para o Japão, para serem analisadas pelo Instituto de Cogumelos Iwade, o qual encaminhou essa mesma amostra para o Dr. Paul Heinemann, especialista em taxonomia de cogumelos na Bélgica, que identificou o fungo como *Agaricus blazei* Murrill. Esta espécie já tinha sido descrita na Flórida, por Murrill, em 1945, uma espécie de ocorrência natural na América do Norte. Ao mesmo tempo em que mandava a amostra para o Japão, o Sr. Furomoto enviou uma amostra para o Instituto Botânico de São Paulo que, imediatamente, enviou-a para o Instituto Real de Botânica, na Inglaterra, aos cuidados do Dr. Pegler, que identificou o cogumelo como sendo muito parecido à espécie *Agaricus silvaticus*, um fungo húmico florestal, de distribuição cosmopolita. Desse modo, as espécies foram consideradas distintas, mesmo tratando-se de um mesmo cogumelo. No entanto, a denominação *Agaricus blazei* tem sido a mais universalmente usada na literatura sobre aspectos biotecnológicos e medicinais do cogumelo, assim como na maioria dos seus produtos comercializados (Amazonas, 2004).

Wasser et al. (2002), em um estudo morfológico comparativo minucioso, demonstraram que a espécie endêmica norte-americana *A. blazei* ss. Murrill e a medicinal brasileira amplamente cultivada *A. blazei* ss. Heinem. são, na verdade, duas espécies diferentes, sendo proposta uma re-classificação da espécie. *Agaricus blazei* ss. Heinemann foi, então, aclamado como uma nova espécie, denominada *Agaricus brasiliensis*.

No entanto, recentemente, Kerrigan (2005), em estudos baseados no sequenciamento da região ITS do rDNA e em análises genéticas de progênes híbridas, verificou que todas as definições que foram atribuídas a esse cogumelo

até o momento (*A. blazei*, *A. silvaticus* e *A. brasiliensis*) são, na verdade, sinônimas de uma única espécie: *Agaricus subrufescens*.

### 2.3 Importância

O cogumelo *A. blazei*, isolado na cidade de Piedade, interior do estado de São Paulo, tem sido objeto de vários estudos no Japão, para onde foi enviado logo após a sua descoberta. O grande interesse nesse cogumelo se deu, inicialmente, pelas suas propriedades medicinais, principalmente a atividade antitumoral (Kawagishi et al., 1988; Kawagishi et al., 1989; Itoh et al., 1994; Osaki et al., 1994; Higaki et al., 1997; Ito et al., 1997).

Trabalhos de fracionamento e análise da atividade antitumoral revelaram que polissacarídeos estavam envolvidos no processo. Posteriormente, verificou-se que a fração com maior atividade antitumoral era compreendida de proteína e polissacarídeo de ligação  $\beta(1\rightarrow6)$ , chamado  $\beta$ -D-glucano (Kawagishi et al., 1989). Logo depois, confirmou-se que as duas substâncias formam um complexo proteína-glucano e que este complexo é que apresenta atividade antitumoral (Kawagishi et al., 1989). Esta descoberta levou a uma série de outros estudos sobre o mecanismo de ação desse complexo proteína-glucano (Itoh et al., 1994; Ito et al., 1997), além da descoberta de outras substâncias presentes no corpo de frutificação de *A. blazei*, apresentando atividades antimutagênicas e bactericidas (Osaki et al., 1994).

Takaku et al. (2001) isolaram uma substância antitumoral da fração lipídica do *A. blazei* chamada ergosterol, que também é encontrada em *Lentinula edodes* (shiitake) e *Polyporus umbellatus*. Esses resultados sugerem que o ergosterol e seu metabólito estejam envolvidos na inibição da angiogênese.

Segundo Mizuno (1995), o cogumelo fresco apresenta de 85% a 87% de água. Quando desidratado, é rico em proteínas e carboidratos, contendo de 40%



a 45% de proteína bruta, 38% a 45% de carboidratos, 6% a 8% de fibra, 5% a 7% de cinzas e 3% a 4% de lipídeos, com predominância do ácido linoléico (70% a 78%). Contêm vitaminas do complexo B (B1 e B2), niacina e grande quantidade de potássio (2,97% de K), além de outros minerais, como P, Mg, Ca, Na, Cu, Zn, Fe, Mn e Mo.

O seu valor nutricional e medicinal, aliado às características peculiares do seu sabor, fragrância de amêndoas (doce e fresca) e excelente textura, o torna particularmente adequado a inúmeras aplicações culinárias, sendo um dos cogumelos cultivados mais valorizados no mercado mundial (Stijve et al., 2002). É um cogumelo que se assemelha ao *Champignon*, mas que apresenta o estipe mais longo e espesso, sendo considerado um material adequado para a composição de pratos japoneses, chineses e ocidentais (Mizuno et al., 1990). Segundo Siqueira (2002), especialista em gastronomia de cogumelos, o *A. blazei* possui sabor adocicado, combinando bem com alimentos doces, temperados com cravo, canela e erva-doce, podendo ser acrescentado às receitas de bolos, compotas de frutas, gelatinas, biscoitos doces e outros.

O cogumelo *A. blazei* é comercializado desidratado, na forma em pó ou fatiado e seu uso é indicado como suplemento alimentar e como “nutracêutico”, considerando suas propriedades nutricionais (“alimento funcional”), sendo consumido também na forma de chá (extrato aquoso quente) ou na forma de suco (extração aquosa a frio), a partir da infusão dos cogumelos já secos em água (Eira, 2003).

#### **2.4 Produção de *Agaricus blazei***

O cultivo de *A. blazei*, segundo Eira (2003), envolve as seguintes etapas: obtenção e manutenção de linhagens (matrizes); produção de inoculante (“semente” ou *spawn*); produção do substrato de cultivo (composto), envolvendo a compostagem, pasteurização e condicionamento do substrato; inoculação do

fungo no composto; incubação; cobertura do substrato colonizado (adição da camada de cobertura) para indução dos corpos de frutificação (cogumelos); colheita e processamento. O seu cultivo requer alta temperatura e umidade, com temperaturas de 25°C durante o dia e 20°C durante a noite e 90% a 95% de umidade relativa (Mizuno, 1995).

No Brasil, normalmente, uma empresa é responsável por todas as etapas de produção e também fornece compostos colonizados para outros produtores com menores recursos tecnológicos. Por isso, há empresas trabalhando com o fornecimento de compostos já colonizados de *A. blazei*. Neste caso, o produtor compra o composto inoculado e colonizado e transfere o material para o campo ou estufa, cuidando apenas das etapas de frutificação, colheita, secagem e comercialização (Dias et al., 2002).

A produção no Brasil, em escala comercial, do *A. blazei* só foi iniciada em 1989, destacando-se, entre os maiores produtores, os estados de SP, MG, RS e PR. A produção nacional atinge, por ano, cerca de 40 toneladas de cogumelo desidratado. Desse total, 95% são destinados à exportação para países orientais, como Coréia, Taiwan e, principalmente, para o Japão, o qual consome cerca de 60 toneladas por ano do produto. Desse total, 50% correspondem ao cogumelo brasileiro, 30% de cogumelo chinês e 20% de produção própria (<http://geocities.yahoo.com.br/cogumelodosol2004/ouro.html>).

Apesar do crescente interesse dos produtores pelo cogumelo *A. blazei*, verifica-se que a produção do mesmo apresenta alguns problemas. Um desses problemas é a falta de uniformidade na produtividade, verificando-se, às vezes, um grande fracasso na produção. Outro problema enfrentado é a falta de uniformidade na composição de  $\beta$ -glucano no cogumelo (Higaki et al., 1997), que é a substância de maior interesse, devido às suas propriedades antitumorais. Todos esses problemas têm sido atribuídos, normalmente, às condições de cultivo do cogumelo, porém, pouco se sabe sobre a variabilidade genética dos

isolados que têm sido utilizados como inoculantes pelos produtores de composto colonizado.

## 2.5 Produção de inoculantes

A produção de inoculantes inicia-se com a formação da matriz primária em placas de petri, a qual, geralmente, é feita a partir do isolamento de fragmentos de um cogumelo (basidioma) sadio (via assexuada para manter as características genéticas do basidioma desejado) (Braga et al., 1998; Eira, 2003). A multiplicação utilizando basidiósporos (via sexuada pelo isolamento monospórico e ou multispórico) tem sido amplamente utilizada para fins de programas de melhoramento, servindo como técnica para aumentar a produtividade e melhorar a qualidade dos basidiomas (Zadrazil & Grabbe, 1983; Eira, 2003). No entanto, a multiplicação por esporos não é indicada para a produção comercial de inoculante, uma vez que promove variações por recombinação genética, gerando basidiomas com características diferentes daquelas de origem (Braga et al., 1998).

A matriz secundária é obtida pela transferência de pequenas porções de micélio da matriz primária para frascos contendo substrato do tipo grãos, serragem ou fibras (composto). O substrato é acondicionado em frascos com tampas forradas internamente com discos de papel de filtro e submetidos à esterilização durante 2 a 4 horas, a 121°C. Os frascos são inoculados em condições assépticas e incubados à temperatura de 25°C durante 20 a 30 dias, período suficiente para que ocorra a colonização total do substrato. Obtidas as matrizes secundárias, estas serão usadas para a produção do inoculante, popularmente conhecido como “semente” ou “*spawn*” (Eira, 2002 e 2003).

Dessa forma, quando as hifas de cogumelos crescem em grandes quantidades de substratos (grãos, serragem, materiais celulósicos ou minerais enriquecidos), sob condições axênicas, recebem o nome de inóculo (termo

diretamente ligado aos propágulos viáveis do fungo, as hifas), inoculante (que, além do inóculo, inclui o veículo sólido ou substrato, como serragem, grãos e outros, traduzindo melhor esse material sólido com crescimento do fungo), “semente” (pela sua relação com a propagação que, no caso dos inoculantes para cultivo de cogumelos, seria assexuada ou vegetativa) e ainda “*spawn*”, que é um termo genérico na literatura mundial próximo a inoculante ou “semente” (Eira & Minihoni, 1997; Eira, 2002 e 2003).

A princípio, a produção de “semente” e composto colonizado estava concentrada no estado de São Paulo, de onde eram enviados para vários estados como Minas Gerais, Espírito Santo, Brasília, entre outros. Por isso, acredita-se que as linhagens utilizadas pelas várias empresas envolvidas sejam iguais ou muito próximas, considerando-se que tenham uma origem comum (Dias, 2005 – comunicação pessoal).

Colauto et al. (2002) caracterizando cinco isolados de *A. blazei* por análise de RAPD, verificaram que três deles não apresentaram qualquer divergência, sendo caracterizados como isolados de uma mesma origem, embora obtidos em locais diferentes do país. Outros dois isolados se mostraram diferentes do primeiro grupo e divergentes entre si, apresentando, entretanto, baixa variabilidade genética.

No entanto, pouco se sabe se, de fato, essas linhagens, ou isolados, tiveram uma origem comum, podendo ao longo do tempo, ter ocorrido algumas variações genéticas morfológicamente imperceptíveis. Um exemplo disso poderia ser a variação nas próprias propriedades medicinais, sem causar qualquer mudança no aspecto ou no tamanho do cogumelo. Além disso, tem-se verificado que a qualidade dos inoculantes fornecidos por diferentes empresas nem sempre apresenta a qualidade desejada, de maneira que os produtores nem sempre conseguem os resultados esperados.

## **2.6 Possíveis fontes de variabilidade em fungos**

Além da variabilidade ocasionada pela mutação, os fungos possuem também sistemas de recombinação que permitem combinar características encontradas nos diferentes indivíduos, em um único indivíduo. Muitos fungos possuem ciclo sexual facilitando, portanto, o seu estudo genético. Em outros fungos, o ciclo sexual não foi ainda descrito ou é, até mesmo, inexistente. Nesses casos, a variabilidade genética pode ser obtida por mecanismos alternativos ao sexo, como, por exemplo, o ciclo parassexual. Além disso, a partir dos anos de 1970, processos artificiais de recombinação começaram a ser descritos em fungos. É o caso da fusão de protoplastos e da transformação, conhecida tanto em leveduras como em fungos filamentosos (Azevedo, 1998). O processo de transformação está bem estabelecido em fungos e constitui mais uma arma disponível ao geneticista e ao biólogo molecular, associando-se a outros sistemas de recombinação em fungos para promover a variabilidade genética (Azevedo, 1998).

Griffiths (1995) relatou que vários tipos de conexões entre células podem permitir a troca de material, tanto como o núcleo inteiro como simplesmente fragmentos. Estas podem também, teoricamente, permitir a troca de material genético mitocondrial ou plasmidial. Outras fontes de variabilidade em fungos foram descritas por Kistler & Miao (1992), que incluem: os cromossomos não essenciais (cromossomos B ou micromossomos), transposons (elementos transponíveis) e elementos genéticos citoplasmaticamente transmitidos (RNA citoplasmáticos e invertrons).

As mutações usualmente ocorrem mais ou menos aleatoriamente ao longo de um cromossomo. A ocorrência de mutações aleatórias em baixa frequência é um aspecto essencial da adaptação das espécies a seu ambiente, pois a evolução requer que a diversidade genética seja gerada aleatoriamente e em taxas reduzidas (Tortora et al., 2002).

A frequência da mutação espontânea é específica para cada organismo e para cada gene e resulta de alterações do material genético por erros que ocorrem na duplicação normal do ácido nucléico. Esses erros podem surgir por substituições ou, ainda, por inserções ou perdas de bases nitrogenadas no DNA, sem que haja um mecanismo de reparo destas modificações (Azevedo, 1998).

Assim como a mutação, os processos de recombinação genética contribuem para a diversidade genética de uma população. Por outro lado, em organismos altamente evoluídos, como os microrganismos atuais, a recombinação tem menos chance de destruir a função de um gene que permite ao organismo realizar uma importante função nova (Tortora et al., 2002).

A evolução de uma espécie é fruto de um grande número de mutações que ocorrem em espaço de tempo que vai de centenas a milhares de anos. Os microrganismos têm se alterado continuamente devido a alterações em suas propriedades genéticas e à aquisição de adaptações a muitos habitats diferentes (Tortora et al., 2002). No caso de cogumelos, a utilização de meios de cultura muito ricos e completamente diferentes dos substratos de cultivo, além de repicagens sucessivas da cultura fúngica utilizada para preservação de linhagens, podem levar à seleção de mutantes auxotróficos, com possíveis alterações simultâneas de outras características da fungicultura (Eira, 2003).

## **2.7 Uso de marcadores moleculares**

O estudo da diversidade genética de qualquer organismo requer a utilização de marcadores precisos e de fácil detecção. Os marcadores morfológicos são muito úteis, porém, são raros e podem sofrer efeitos ambientais. Isoenzimas têm sido utilizadas como marcadores e já foram utilizados por alguns autores para avaliar a variabilidade genética de cogumelos, como *Agaricus brunnescens* (Royse & May, 1982), *A. bitorquis* (Roux & Labarere, 1990) e *Pleurotus ostreatus* (Zervakis et al., 1994). Porém, esta

técnica apresenta algumas desvantagens, como variações em função da idade e do micélio utilizado para análise (Michelmore & Rulbert, 1987). Por isso, os marcadores moleculares, baseados na seqüência de nucleotídeos do DNA, têm sido utilizados como importantes ferramentas de auxílio na caracterização genética de microrganismos (Michelmore & Rulbert, 1987).

O uso de marcadores moleculares baseados no DNA, como PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*, ou reação em cadeia da polimerase) e sua variante RAPD (do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*, ou DNA polimórfico amplificado ao acaso), o RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), o DNA mitocondrial (mtDNA) e o DNA ribossomal (rDNA), tem apresentado algumas vantagens para a caracterização genética de microrganismos. Dentre estas vantagens, destaca-se o fato de não sofrer variação em função de condições ambientais, tipo de tecido, estágio de desenvolvimento do organismo, além de apresentar um número quase ilimitado de marcas que podem ser detectadas (Neale et al., 1992). Essas técnicas têm sido empregadas na análise da diversidade genética e no estudo das relações intra e interespecíficas de diferentes espécies, populações e indivíduos (Schots et al., 1994).

### 2.7.1 RAPD

Uma das técnicas mais utilizadas no estudo de variabilidade genética tem sido a utilização de marcadores moleculares RAPD, uma variação da técnica de PCR, mas que utiliza apenas um iniciador (*primer*) de seqüência arbitrária, ao invés de um par de iniciadores de seqüência conhecida, como normalmente utilizado na técnica de PCR (Williams et al., 1990). Esses *primers*, únicos e de seqüência arbitrária, apresentam um pequeno tamanho (em torno de 10 nucleotídeos), composição de bases G+C igual ou superior a 50% e menor

temperatura de pareamento (Williams et al., 1990). Essas características fazem com que ocorra o pareamento desses *primers* em diferentes regiões do genoma, gerando fragmentos de DNA amplificados de diferentes tamanhos.

Os polimorfismos são de natureza binária, que resultam de mutações ou rearranjos nos sítios de ligação dos *primers* ou entre eles e são frequentemente detectados pela presença ou ausência de um produto de amplificação. Isso significa que os marcadores RAPD geralmente se comportam como marcadores dominantes, ficando evidente, portanto, a desvantagem de não identificar heterozigotos. O polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados pode ser devido a uma variedade de mecanismos, como a substituição de nucleotídeos que cria ou elimina um sítio de ligação do oligonucleotídeo, também deleção, inserção ou inversão nesse sítio de pareamento ou dos segmentos entre os mesmos e, ainda, grandes inserções, que separam sítios de pareamento, tornando-os grandes demais para serem amplificados (Caetano-Anollés & Bassam, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Uma grande limitação observada na técnica de RAPD é a de que há muita suscetibilidade à contaminação (interferência) por DNA não alvo e a mesma só pode ser realizada de modo seguro com DNA de culturas puras (Leal et al., 1997). A técnica de RAPD tem mostrado grande potencial na detecção de polimorfismos de muitos microrganismos, porém, devido ao fato desta técnica não requerer conhecimento prévio da sequência de DNA do organismo em estudo, é necessário que se teste um grande número *primers* para, posteriormente, selecionar os que melhor detectem os polimorfismos de DNA. Alguns autores também apontam como desvantagem da técnica a falta de repetibilidade de seus resultados (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Ela tem a vantagem de ser altamente sensível a diferenças de nucleotídeos entre o *primer* e o DNA molde. É uma técnica rápida, não envolve hidridização ou radioatividade (Michelmore et al., 1991), além de requerer uma



pequena quantidade de DNA e, não necessariamente, de alta qualidade (Manulis et al., 1993).

A técnica de RAPD, desde o seu desenvolvimento, tem sido extremamente útil em vários tipos de estudos genéticos em plantas, destacando-se o estudo de diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma, bem como para o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica de RAPD é também muito útil na análise de diversidade genética de fungos filamentosos, mostrando-se um excelente método para identificação e diferenciação de raças de determinadas espécies fitopatogênicas, conforme descrito para *Colletotrichum lindemuthianum*, no qual foi possível determinar distâncias genéticas entre isolados inter e intra-raciais (Otoya et al., 1995; Mesquita, 1997).

Camargo Jr. (2004), estudando a forma sexuada de *C. lindemuthianum* pela técnica de RAPD, identificou recombinantes de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, caracterizando o fungo como sendo pseudo-homotático, capaz de produzir peritécios férteis e viáveis a partir de duas linhagens compatíveis, cujos descendentes apresentaram similaridade genética que variou de 49% a 63% em relação aos parentais.

Com o propósito de estudar a similaridade genética entre diversos isolados de *Aspergillus fumigatus*, Aufavre-Brown et al. (1992) utilizaram sete *primers* previamente selecionados, os quais geraram bandas polimórficas que permitiram aos autores concluir que a técnica de RAPD é extremamente eficiente para caracterizar ou distinguir isolados pertencentes, muitas vezes, a um mesmo grupo geneticamente relacionado.

Zimand et al. (1994) analisaram cerca de 43 linhagens de *Trichoderma* spp. por meio de marcadores RAPD, utilizando um total de nove *primers*. Por

meio dos padrões de bandas geradas pela técnica, pôde-se verificar que, dentro de 23 linhagens de *T. harzianum*, dez compartilharam padrões de RAPD similares, as quais originaram-se de diferentes regiões geográficas.

Em fungos da divisão Basidiomycota, há também registros acerca da utilização da técnica de RAPD para o estudo da diversidade genética. Junghans et al. (1998) analisaram o polimorfismo de fragmentos amplificados ao acaso de 22 isolados de *Pisolithus tinctorius* provenientes de diferentes regiões do Brasil, Estados Unidos e França, verificando uma grande diversidade genética entre os mesmos. A análise de agrupamento indicou a presença de dois grupos, separando-os de acordo com a origem geográfica e o hospedeiro.

Lana (2004), em estudo de caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso*, analisou 37 isolados do fungo por RAPD e seqüenciamento de regiões do rDNA. A análise por marcadores RAPD separou os 37 isolados em 8 grupos. Por esta análise, foi possível observar que linhagens com 100% de similaridade foram isoladas de locais diferentes, enquanto que isolados obtidos de uma mesma planta podem ser geneticamente diferentes. Já a análise da seqüência do rDNA dos isolados mostrou a formação de 6 grupos distintos, dentre os quais isolados obtidos de uma mesma planta não se agruparam, reforçando a hipótese de que isolados geneticamente diferentes podem ocupar a mesma planta hospedeira.

Esta técnica também tem sido utilizada para avaliar a variabilidade genética de culturas monospóricas e caracterizar sistemas heterotáticos e homotáticos em espécies do gênero *Agaricus* (Calvo-Bado et al., 2001), além de auxiliar na construção de mapas genéticos em fungos basidiomicetos (Larraya et al., 2000; Muraguchi et al., 2003).

No caso dos cogumelos comestíveis, a utilização dos marcadores RAPD já foi descrita para algumas espécies. Zhang & Molina (1995) utilizaram a técnica para diferenciação de isolados de *Lentinula edodes* (Shiitake). Os

resultados indicaram que apenas 2 dos 15 isolados analisados mostraram perfis idênticos de RAPD em todos os *primers* testados, enquanto que os demais isolados apresentaram padrões únicos de DNA *fingerprints*. Estes autores concluíram que a técnica pode ser utilizada com sucesso para diferenciação de isolados de *L. edodes*, com potencial de serem utilizados em programas de melhoramento genético.

A técnica de RAPD também foi utilizada em estudos de caracterização genética de *Agaricus bisporus* (Khush et al., 1992). Segundo os autores, de três linhagens comerciais analisadas, duas mostraram-se idênticas ou proximamente relacionadas. Estes resultados corroboraram, segundo os próprios autores, com os resultados obtidos por Loftus et al. (1988) ao analisarem, por RFLP, três linhagens híbridas vendidas na Europa como linhagens diferentes, mas que se mostraram geneticamente idênticas.

Ramirez et al. (2001), também em estudos para diferenciação de isolados comerciais do cogumelo *A. bisporus*, utilizando marcadores RAPD e a análise de “bulks” segregantes, verificaram o alto nível de homologia genética entre a maioria dos isolados e formação de dois grupos distintos de acordo com o tamanho dos basidiocarpos.

Colauto et al. (2002), caracterizando 5 isolados de *A. blazei* também por análise de RAPD, verificaram que 3 dos isolados não apresentaram qualquer divergência, sendo caracterizados como isolados de uma mesma origem, embora obtidos em locais diferentes do país. Outros dois isolados se mostraram diferentes do primeiro grupo e divergentes entre si, apresentando, entretanto, baixa variabilidade genética.

Marques et al. (2004) analisaram três acessos de isolados de *A. blazei* cultivados por diferentes produtores e também um acesso de *A. bisporus*, por meio da técnica de RAPD. Os resultados com base nos locos RAPD obtidos com os 148 *primers* testados não mostraram diferenças entre os indivíduos de

*A. blazei* analisados, indicando que as pequenas diferenças morfológicas entre os acessos, segundo os autores, são justificadas por fatores ambientais, como o substrato utilizado no cultivo do cogumelo.

### 2.7.2 RFLP

A técnica de RFLP se baseia nas diferenças na seqüência primária do DNA nos sítios de clivagem específicos das enzimas de restrição. O polimorfismo resulta de diferenças específicas na seqüência de DNA, tais como substituição, adição ou deleção de um único par de bases ou, ainda, grandes alterações cromossômicas, como inversões ou translocações. Essas diferenças alteram os tamanhos dos fragmentos obtidos pela digestão do DNA com endonucleases do tipo II (Michelmore & Hulbert, 1987).

A análise por RFLP detecta variações nas regiões complementares a uma sonda (fragmento de DNA) e próximas a ela. Por atuar de maneira codominante, marcadores RFLP distinguem genótipos homocigoto de heterocigoto, fornecendo informação sobre ligação gênica a partir dos dados de segregação. Entre as aplicações do RFLP citam-se: obtenção de mapas genéticos saturados, permitindo enumeração e distribuição dos genes determinantes de caracteres quantitativos, estudo da organização e evolução do genoma fúngico, identificação de linhagens específicas por meio do padrão de bandas, estudo das bases genéticas da variabilidade, identificação de genes específicos, estudos de genética de população, epidemiologia, taxonomia e relação filogenética (Michelmore & Hulbert, 1987).

Por meio da técnica de RFLP, Marmeisse et al. (1992) diferenciaram onze espécies do fungo ectomicorrízico *Hebeloma*, por meio de sete padrões de restrição. Duas sondas de DNA genômico utilizadas permitiram a detecção de padrões característicos para cada uma das dez espécies estudadas. Uma terceira

sonda hibridizou somente com o DNA de *H. cylindrosporum*, sendo, portanto, espécie-específica.

Hulbert & Michelmore (1988), em estudos do polimorfismo dos fragmentos de restrição do fungo *Bremia lactucae*, em que se utilizaram 35 sondas, demonstraram a existência de grande variabilidade genética dentro da população, sendo que a maior diversidade genotípica foi encontrada nos isolados que apresentavam reprodução sexual.

### 2.7.3 DNA mitocondrial (mtDNA)

De acordo com Bruns et al. (1991), o DNA mitocondrial também tem sido utilizado como marcador molecular, em virtude das seguintes características: possui um tamanho reduzido, variando de 17 a 176 Kb; não apresenta metilação de bases nitrogenadas; o genoma possui grande número de cópias, permitindo a visualização dos fragmentos de restrição com facilidade via hibridização com sondas de mtDNA; e é rico em RFLP em nível intra-específico.

Watson et al. (1987) relataram que a elevada taxa de mutação no mtDNA é explicada pela ausência de atividade exonucleásica 3'-5' como mecanismo de reparo na DNA polimerase mitocondrial. Dessa forma, a evolução do mtDNA pode ocorrer de maneira extremamente rápida. Em razão dessas características, o mtDNA é útil no estudo de relação filogenética de populações ou isolados com características próximas (Kim et al., 1992).

Em *Fusarium oxysporum*, tem-se caracterizado, por meio de mtDNA, a diversidade entre isolados patogênicos com o objetivo de determinar relações genéticas entre *formae speciales* (Kim et al., 1993).

Para algumas espécies de fungos, a análise de mtDNA tem possibilitado a identificação de considerável variação entre isolados, no entanto, em alguns casos, apenas possibilita diferenciação entre espécies (Bruns et al., 1991).

Gomes (1999), ao analisar doze isolados do fungo *Pisolithus* spp. coletados de diferentes regiões do mundo, por RFLP do mtDNA, verificou que sete isolados do Brasil apresentaram padrão de bandas de restrição diferente dos cinco isolados do hemisfério norte, observando uma correlação entre o padrão de restrição do mtDNA e origem geográfica dos isolados.

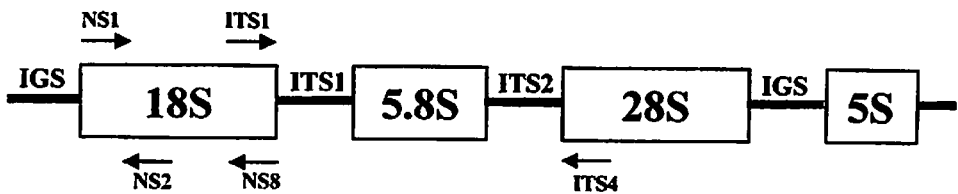
#### **2.7.4 DNA ribossomal (rDNA)**

O DNA ribossomal (rDNA) está presente em todos os organismos e é composto de várias regiões distintas (genes e espaçadores). O rDNA, ao contrário de outras seqüências repetitivas que aparentemente não têm função conhecida no genoma, codifica o rRNA, associado ao processo de tradução de proteínas. A síntese de proteínas depende da participação do rRNA no processo de tradução da informação genética. A codificação do rRNA é feita em regiões específicas do genoma pelo chamado rDNA, o qual está contido nas regiões organizadoras do nucléolo (RON) e tem sido objeto de um grande número de estudos, com diversas aplicações na genética, evolução e melhoramento (Fungaro, 2000), sendo utilizado extensivamente em estudos filogenéticos de fungos (Bruns et al., 1991; Bunyard et al., 1995 e 1996).

O rDNA, na maioria dos eucariotos, incluindo todos os fungos verdadeiros, é caracteristicamente repetitivo, uma propriedade que permite um grande número de aplicações. O fato de ser repetitivo implica que uma certa estrutura ou seqüência de nucleotídeos se repita lado a lado (em “tandem”) inúmeras vezes. Sendo assim, por ser repetitivo e por estar situado em regiões específicas do genoma, a proporção de rDNA é, em geral, alta em relação ao conteúdo total de DNA da espécie (Fungaro, 2000). O número de cópias de rDNA varia entre as espécies e pode ter de 60 a 220 cópias por genoma haplóide de um fungo (Pipe et al., 1995).

Nos estudos da organização do rDNA do basidiomiceto *Thanatephorus praticola*, estimou-se o tamanho da unidade repetitiva de rDNA em 8,8 Kb e o número de cópias do rDNA em 59 por genoma haplóide. A região que codifica o rRNA 5S mostrou-se como parte da unidade repetitiva, semelhante ao encontrado em outros fungos da divisão Basidiomycota (Vilgalys & Gonzalez, 1990).

A unidade de rDNA apresenta componentes, em sua seqüência, que envolvem variações e podem ser usados em estudo de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (Fouly et al., 1997). Cada unidade de repetição consiste de regiões codificadas para os genes rRNA 18S, 5.8S e 28S, e dois espaços internos (ITS1 e ITS2) que separam essas regiões (Figura 1). Cada unidade do rDNA é separada por um espaço intergênico (IGS). A ordem dos genes parece ser conservada em todos os organismos, com exceção do gene 5S, que pode ou não estar dentro da região repetida (Bruns et al., 1991).




**FIGURA 1** Mapa da organização dos genes ribossomais (rDNA) em fungos. A posição dos iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação das regiões 18S e ITS está indicada. O gene ribossomal 5.8S RNA nesse grupo de organismo está localizado na região ITS.

Entre espécies, as regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) auxiliam estudos taxonômicos em vários grupos, como os fungos (Carbone & Kohn, 1997). As regiões rDNA 18S e 28S são muito conservadas e podem ser utilizadas para diferenciação em nível de gênero e de espécie (Maiwald et al., 1994; Berbee & Taylor, 1995; Bunyard et al., 1995 e 1996; Gargas & Depriest, 1996; Kim et al., 1999; Nascimento & Martinez-Rossi, 2001). Por outro lado as regiões espaçadoras ITS (do inglês *Internal Transcribed Spacers*) e IGS (do inglês *Intergen Spacer*) acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies ou entre isolados da mesma espécie (Ristaino et al., 1998; Hijri et al., 1999; Esteve-Zarzoso et al., 1999; Azevedo et al., 2000; Anderson et al., 2001; Oliveira & Costa, 2002; Gomes et al., 2002; Brasileiro et al., 2004; Leonardi et al., 2005).

O agrupamento em “tandem” determina freqüentes oportunidades para a ocorrência de “pareamento incorreto” entre genes cujas seqüências são as mesmas, mas que estão em diferentes posições nos respectivos agrupamentos. Graças à contínua expansão e contração de subunidades através de permuta genética (*crossing-over*) desigual, é possível que todas as unidades de um agrupamento sejam derivadas de uma proporção bastante pequena de unidades de um agrupamento ancestral. Os tamanhos variáveis dos espaçadores são consistentes com a idéia de que eventos de permuta genética desigual têm lugar em espaçadores que estão mal pareados internamente. Isto pode explicar a homogeneidade dos genes em comparação com a variabilidade dos espaçadores. Os genes são expostos à seleção quando unidades de repetição individuais são amplificadas no interior do agrupamento; os espaçadores, porém, são irrelevantes e podem acumular alterações (Lewin, 2001). Segundo Rogers & Bendich (1987), na maioria dos fungos, a região IGS é a mais polimórfica, devido à permuta genética desigual envolvendo seqüências sub-repetitivas dentro do IGS.





A presença de seqüências conservadas do rDNA (genes 18S, 5.8S e 28S) permite que *primers* para PCR sejam desenhados e utilizados para uma ampla variedade de espécies fúngicas. Esses são chamados *primers* universais (White et al., 1990). Segundo Fungaro (2000), o fato das regiões ITS serem flanqueadas por regiões conservadas, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade. Embora não traduzidas dentro de proteínas, as ITS codificam regiões que têm um papel crítico no desenvolvimento do rRNA funcional, com variações na seqüência entre espécies, mostrando-se muito promissoras em ensaios moleculares.

### 2.7.5 PCR-RFLP

A técnica do PCR-RFLP do rDNA, também conhecida como ARDRA (do inglês *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*, ou análise de restrição do DNA ribossomal amplificado), consiste na amplificação via PCR de regiões do rDNA, que incluem os genes 18S e 28S e os espaçadores ITS e IGS, e posterior clivagem da região amplificada com enzimas de restrição gerando padrões de RFLP. A associação é necessária para detectar polimorfismo adicional entre bandas monomórficas, as quais possuem o mesmo tamanho em pares de bases e as mesmas seqüências nas extremidades onde o *primer* iniciou a amplificação. Entretanto, internamente, os segmentos podem apresentar diferenças pontuais em pares de bases que resultam na perda ou ganho de um ou mais sítios de restrição (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica de PCR-RFLP baseia-se no uso de enzimas de restrição que corta o DNA em sítios específicos, gerando fragmentos polimórficos de diferentes tamanhos. São úteis as enzimas do tipo II, que reconhecem seqüências específicas no DNA e só requerem Mg como cofator. As enzimas normalmente

usadas reconhecem seqüências de 4 a 6 pb, havendo redução de corte por aquelas enzimas que não reconhecem carbonos metilados.

A análise do DNA ribossômico (rDNA) por reação em cadeia da polimerase (PCR), associada ao polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), tem sido amplamente utilizada em estudos taxonômicos de fungos (Bruns et al., 1991; Driver et al., 2000), de filogenia (Bunyard et al., 1995 e 1996), de diversidade genética (Viaud et al., 2000; Anderson et al., 2001; Gomes et al., 2002), na identificação e diferenciação de espécies (Fouly et al., 1997; Kim et al., 1999; Azevedo et al., 2000; Galvão, 2004; Leonardi et al., 2005; Alves et al., 2005). Também tem sido uma ferramenta útil na discriminação de isolados de fungos dentro de uma mesma espécie (Ristaino et al., 1998; Hijri et al., 1999; Paavanen-Huhtala et al., 1999; Oliveira & Costa, 2002; Brasileiro et al., 2004; Otero et al., 2004).

Para análise da região ITS, são utilizados *primers* (ITS1/ITS4 ou ITS1/ITS5) baseados em regiões conservadas do rDNA para amplificar o espaçador interno transcrito (ITS1-5.8S-ITS2). Essa é uma região que separa os genes 18S e 28S e pode ser amplificada com *primers* que anelam nesses dois genes (White et al., 1990; Herion et al., 1994).

Gardes & Bruns (1993) descreveram o *primer* ITS1F, que foi otimizado para amplificar DNA de fungos e ITS4B, específico para amplificação de DNA de fungos basidiomicetos. Larena et al. (1999) descreveram o *primer* ITS4A, para amplificar especificamente o DNA de fungos ascomicetos.

A região ITS, que compreende a porção codificante 5.8S e as duas regiões ITS1 e ITS2, exibe um alto grau de polimorfismo interespecífico, sendo bastante conservada dentro de algumas espécies, representando, assim, um marcador genético valioso para a identificação de espécies e para estudos filogenéticos (Bruns et al., 1991; Hillis & Dixon, 1991; Galvão, 2004; Alves et al., 2005; Leonardi et al., 2005). A região ITS tem sido também utilizada para

Durante a década de 1990, alguns trabalhos foram publicados sobre a cariotipagem eletroforética de fungos filamentosos, principalmente fungos fitopatogênicos. Vankan et al. (1993) analisaram cinco linhagens de *Botrytis cinerea* e verificaram que nenhuma das cinco linhagens apresentou padrão idêntico à outra e, além disso, os autores verificaram que todas as linhagens continham um ou vários minicromossomos de tamanho variável.

Estudos com vários patótipos de *Fusarium oxysporum* revelaram padrões eletroforéticos que permitiram um agrupamento similar ao obtido por análises de Grupos de Compatibilidade Vegetativa (VCG) e por RFLP (Migheli et al., 1995), mostrando que a técnica de PFGE é uma ferramenta promissora para o estudo da genética de populações deste fungo.

Segundo Howlett (1997), a técnica de PFGE tem revelado que muitos fungos apresentam um alto polimorfismo no tamanho dos seus cromossomos e, normalmente, os únicos isolados com cariótipos idênticos são derivados de um único clone. Considerando que o tamanho e o número de cromossomos dentro de isolados de uma espécie particular são normalmente constantes, a técnica de PFGE pode distinguir entre fungos que sofreram algum polimorfismo, porém, permaneceram morfolologicamente similares. Segundo o mesmo autor, esta técnica pode ser usada para acompanhar a herança de polimorfismos cromossômicos e mostrar que, em alguns fungos, cromossomos de novo tamanho são produzidos durante a meiose. Além disso, a técnica apresentaria também uma sensibilidade para detectar a presença de cromossomos tipo-B, mtDNA e plasmídios lineares.

Segundo Fierro & Martin (1999), tanto os fungos de reprodução sexuada como os de reprodução assexuada sofrem rearranjos cromossômicos, os quais são a principal causa de variabilidade no cariótipo entre as populações.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos e no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (DBI/UFLA).

#### 3.1 Isolados

Foram utilizados nove isolados de *Agaricus blazei* (CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS8 e CS9) obtidos a partir de inoculantes (“sementes”) de diferentes fontes comerciais, de cogumelos obtidos de produtores e também de cogumelos colhidos na região de origem no interior do estado de São Paulo. Foram também utilizadas duas diferentes linhagens do cogumelo *Agaricus bisporus* (*Champignon de Paris*, CHP e *Portobello*, PB), que serviram como controle durante as análises moleculares. Todos estes isolados fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do Departamento de Biologia da UFLA e se encontram listados na Tabela 1.

Os isolados CS4, CS5 e CS7 correspondem, respectivamente, aos isolados ABL 97/11, ABL 99/25 e ABL 99/29 da coleção de cogumelos da UNESP/FCA de Botucatu, SP, os quais foram cedidos à coleção do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais da UFLA.

O isolado CS9, segundo o produtor de Elói Mendes, MG, que forneceu os basidiocarpos deste cogumelo, corresponde à linhagem *A. blazei* Jun-17, do Japão, comercializada no Brasil pela Fazenda Guirra, em São José dos Campos, SP. O *A. blazei* Jun-17 corresponde ao isolado ABL 99/26 da coleção da UNESP/FCA de Botucatu, SP.

**TABELA 1** Relação dos isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei* utilizados no estudo e sua procedência.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>
<i>Agaricus bisporus</i>	CHP	São Paulo (Produtor)
<i>Agaricus bisporus</i>	PB	Estados Unidos
<i>Agaricus blazei</i>	CSI	Vitória, ES (Produtor)
<i>Agaricus blazei</i>	CS2	Belo Horizonte, MG (Produtor)
<i>Agaricus blazei</i>	CS3	Belo Horizonte, MG
<i>Agaricus blazei</i>	CS4 (ABL 97/11)	São Paulo, SP (Vitagaricus)
<i>Agaricus blazei</i>	CS5 (ABL 99/25)	Araçatuba, SP (Produtor)
<i>Agaricus blazei</i>	CS6	Leme, SP
<i>Agaricus blazei</i>	CS7 (ABL99/29)	Porto Alegre, RS
<i>Agaricus blazei</i>	CS8	Elói Mendes, MG (Produtor)
<i>Agaricus blazei</i>	CS9	Elói Mendes, MG (Produtor)

### 3.2 Meio de cultivo

Para a manutenção das culturas e crescimento fúngico, os isolados foram cultivados em um meio de cultura denominado meio básico (MB), constituído de 1% de glicose, 0,1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,05% de  $\text{CaCl}_2$ , pH 5,5. O MB foi enriquecido com peptona e extrato de levedura a 0,1% cada e suplementado com micronutrientes ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 10mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 7mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 4mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 1mg/L), sendo assim denominado MBC (meio básico completo). Para o cultivo em placas de petri, foi adicionado ágar a 1,5 %.

### **3.3 Obtenção do micélio utilizado para extração de DNA**

A massa micelial foi obtida em frascos de vidro contendo 150mL do MBC líquido, os quais foram inoculados com fragmentos contendo micélio do fungo retirado das bordas de colônias crescidas em meio MBC sólido, com idade aproximada de 14 dias. Os frascos foram incubados à temperatura ambiente, sem agitação, por um período que variou de 25 a 30 dias de crescimento.

### **3.4 Extração de DNA total**

A extração de DNA foi realizada com base na técnica descrita por Raeder & Broda (1985) com algumas modificações. O micélio, crescido no meio descrito anteriormente, foi filtrado e coletado em papel de filtro estéril, removendo-se o excesso de líquido em gaze e papel absorvente, previamente esterilizados. O micélio foi congelado e mantido à temperatura de -20°C até o momento da extração. Para a extração, o micélio foi pesado e transferido para gral de porcelana, previamente resfriado em congelador e macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O micélio macerado foi transferido para tubos Falcon de 50mL. Para cada grama de micélio, foram adicionados 5mL do tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8,0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 2%). Os tubos foram incubados a 65°C, por 15 minutos, adicionando-se, a seguir, um volume de fenol-clorofórmio (1:1) tamponado com Tris-HCl 1M pH 8,0. A mistura foi agitada gentilmente por 15 minutos, sempre mantendo o material gelado e, logo depois, procedeu-se a centrifugação a 4.900 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo Falcon de 50mL, adicionando-se um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada gentilmente por 15 minutos e centrifugada novamente, conforme descrito anteriormente e a fase aquosa foi transferida para novo tubo Falcon de 50mL, adicionando-se um

volume de clorofórmio, com nova etapa de agitação seguida de centrifugação conforme já descrito.

A fase aquosa final foi coletada, transferindo-a para tubos *ependorf* de 1,5mL (750 $\mu$ L/tubo), adicionando-se a seguir um volume de isopropanol gelado, mantendo-se os tubos a -20°C por, pelo menos, 1 hora para a precipitação do DNA. A seguir, foi feita uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante e lavando-se o precipitado (*pellet*) com etanol 70% por duas vezes, antes de secá-lo e ressuspê-lo em 20 $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM) por tubo. O DNA da mesma amostra foi reunido em um só tubo, homogeneizado e distribuído em volumes iguais em tubos *ependorf* e armazenado à -20°C.

Após a extração, a qualidade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando-se 2 $\mu$ L do DNA de cada amostra mais 2 $\mu$ L de tampão de corrida azul de bromofenol e quantificado por meio do fluorímetro Hoefer Scientific TKO 100. Para isso, foram usados 2 $\mu$ L de cada amostra de DNA em 2mL de tampão (Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1 $\mu$ g/mL do corante Bisbenzimidide (Hoechst 32258). Após a quantificação, o DNA foi diluído com TE (Tris-HCl 1mM pH 8,0; EDTA 0,1mM) para concentração final de 10ng/ $\mu$ L, a qual foi usada nas reações de RAPD e PCR.

### 3.5 Análise da variabilidade genética de *A. blazei* por RAPD, PCR-RFLP do rDNA e seqüenciamento de regiões do rDNA

#### 3.5.1 Análise da variabilidade por RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12 $\mu$ L, contendo 20ng de DNA genômico, 0,4 $\mu$ M de *primer*, 100 $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), tampão de reação pH 8,0 (50mM de Tris-HCl, 20mM de KCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 $\mu$ g/mL de BSA, 1% de ficoll 400, 1mM de tartrazine), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e água Milli-Q autoclavada até o volume de 12 $\mu$ L. As amplificações foram feitas em termociclador Mastercycler PCR (Eppendorf), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos, sendo que cada ciclo consistiu de uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de anelamento a 35°C por 30 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto e, finalmente, uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Foram testados 108 *primers*, de diferentes seqüências aleatórias, sintetizadas pela empresa Operon. Na Tabela 2 constam os 50 *primers* e suas respectivas seqüências que apresentaram amplificação e polimorfismo de DNA e que foram utilizadas para análise de RAPD.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE (Tris-borato 0,045M e EDTA 0,001M) a 80V, por aproximadamente 3 horas. Como padrão de tamanho de bandas, foi utilizado DNA do fago lambda ( $\lambda$ ) clivado com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III. Após o término da corrida de eletroforese, os fragmentos de DNA amplificados foram corados com brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/mL) por aproximadamente 20 minutos, lavado o excesso do corante em água destilada e fotodocumentados sob luz ultravioleta (U.V.)



**TABELA 2** Sequência e conteúdo de CG dos *primers* utilizados para análise de isolados de *Agaricus* spp. por marcadores RAPD.

<i>Primer</i>	Sequência 5'- 3'	Conteúdo CG (%)
OPB-07	GGTGACGCAG	70
OPL-02	TGGGCGTCAA	60
OPL-06	GAGGGAAGAG	60
OPL-08	AGCAGGTGGA	60
OPL-10	TGGGAGATGG	60
OPL-14	GTGACAGGCT	60
OPL-15	AAGAGAGGGG	60
OPL-16	AGGTTGCAGG	60
OPL-18	ACCACCCACC	70
OPM-07	CCGTGACTCA	60
OPM-08	TCTGTTCCCC	60
OPM-09	GTCTGCGGA	60
OPM-10	TCTGGCGCAC	70
OPM-11	GTCCACTGTG	60
OPM-13	GGTGGTCAAG	60
OPM-14	AGGGTCGTTC	60
OPM-15	GACCTACCAC	60
OPM-16	GTAACCAGCC	60
OPM-19	CCTTCAGGCA	60
OPM-20	AGGTCTTGGG	60
OPAN-01	ACTCCACGTC	60
OPAN-06	GGGAACCCGT	70
OPAN-12	AACGGCGGTC	70
OPAN-13	CTTCCAGGAC	60
OPAN-14	AGCCGGGTAA	60
OPAN-15	TGATGCCGCT	60
OPAN-17	TCAGCACAGG	60
OPAN-18	TGTCCTGCGT	60
OPAQ-06	ACGGATCCCC	70
OPAQ-08	TCGGTAGACC	60
OPAQ-10	CATACCTCC	60
OPAQ-12	CAGTCCTGT	60
OPAQ-14	CCCCTGTAGG	70
OPAT-20	ACATCAGCCC	60
OPAU-14	CACCTCGACC	70
OPAU-15	TGCTGACGAC	60
OPAU-17	TTGGCATCCC	60
OPAW-04	AGGAGCGACA	60
OPAW-08	CTGTCTGTGG	60
OPAW-10	GGTGTITGCC	60
OPAW-12	GAGCAAGGCA	60
OPAW-14	GGTTCGTCTC	60
OPAW-16	TTACCCCGCT	60
OPAW-18	GGCGCAACTG	70
OPAX-18	GTGTGCAGTG	60
OPAX-20	ACACTCGGCA	60
OPAZ-04	CCAGCCTCAG	70
OPAZ-12	GATGGGCCTG	70
OPAZ-16	AGGCGAACTG	60
OPAZ-18	CCGACGTTGA	60

### 3.5.1.1 Análise dos dados

Os dados obtidos nos géis de eletroforese foram transformados em dados binários (1 para presença e 0 para a ausência de bandas). Para análise, foram consideradas apenas as bandas fortes. Os dados foram analisados no programa NTSYS-PC 2.1 (do inglês *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), o qual construiu uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Dice (Rohlf, 1992). A partir dessa matriz foi construído o dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (do inglês *Unweighted pair-group method with arithmetical averages*), estabelecendo as relações genéticas entre os diferentes isolados. O dendrograma agrupou os isolados mostrando o nível de similaridade genética entre eles.

A estimativa da similaridade genética ( $sg_{ij}$ ) entre cada par de indivíduos  $i$  e  $j$  foi efetuada de acordo com a seguinte expressão:  $sg_{ij} = 2a / (2a + b + c)$ , em que:

$a$  = número de bandas comuns aos isolados  $i$  e  $j$ ;

$b$  = número de bandas presentes em  $i$  e ausentes em  $j$ ;

$c$  = número de bandas presentes em  $j$  e ausentes em  $i$ .

### 3.5.2 Análise da variabilidade por PCR-RFLP da região ITS do rDNA

#### 3.5.2.1 Amplificação da região ITS por PCR

A região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de cada um dos isolados foi amplificada utilizando-se os *primers* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), conforme descrito por White et al. (1990). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 $\mu$ L, contendo: 20ng de DNA genômico; 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,4 $\mu$ M de cada *primer*; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão da enzima 1X (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM); 1,25U da enzima *Taq* DNA polimerase e

água Milli-Q autoclavada até o volume de 50 $\mu$ L. As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycler (Eppendorf) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e, finalmente, uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, parte da reação (5 $\mu$ L) foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 0,045M e EDTA 0,001M) a 90V por 2 horas e 30 minutos. Os fragmentos de DNA foram corados com brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/mL) durante 20 minutos e fotodocumentados sob luz U.V.

### **3.5.2.2 Precipitação dos produtos de PCR amplificados**

Antes da análise de RFLP, o produto da amplificação foi precipitado, adicionando-se na reação 67,5 $\mu$ L de isopropanol em cada amostra, as quais foram mantidas a -20°C por, pelo menos, 2 horas. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 25 minutos. Foi descartado todo o sobrenadante e lavado o precipitado com etanol 70%, adicionando-se 90 $\mu$ L em cada amostra. Novamente as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, removendo-se todo o etanol 70% com auxílio de uma micropipeta. O precipitado foi então ressuspensionado em 50 $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada e 5 $\mu$ L do DNA amplificado de cada amostra foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos foram corados com brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/mL) e fotodocumentados sob luz U.V.

### **3.5.2.3 Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição**

Os produtos de PCR foram digeridos com diferentes enzimas de restrição: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *AluI*, *CfoI*, *MspI*, *RsaI*, *HinfI*, *HaeIII*, *BglII*, *BamHI*, *XbaI*, *PstI*, *DraI* e *XmnI*. As reações de clivagem foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, em um volume final de 20 $\mu$ L,

contendo em cada reação, 5 a 10µL do produto amplificado, 5U da enzima a ser testada, 2µL de tampão 10X de cada enzima, 2µg de BSA (10µg/µL) e água Milli-Q autoclavada para o volume final de 20µL. As amostras foram incubadas à 37°C por, pelo menos, 3 horas e os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% imerso em tampão TBE 1X a 70V por 4 horas. Os fragmentos foram corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e fotodocumentados sob luz U.V.

### 3.5.3 Sequenciamento de regiões do rDNA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular e no Laboratório de Sequenciamento do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, Campus “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba, SP.

#### 3.5.3.1 Amplificação do DNA por PCR

Os *primers* utilizados para a amplificação da região espaçadora ITS (ITS1-5.8S-ITS2) e parte do gene 18S do rDNA encontram-se listados na Tabela 3. Eles foram suspensos em água Milli-Q autoclavada para concentração final de 50µM e 100µM, respectivamente. As soluções de trabalho foram utilizadas na concentração de 2µM.

**TABELA 3** *Primers* utilizados para amplificação do rDNA de *Agaricus spp.*

<i>Primer</i>	Seqüência 5'- 3'	Região	Nº pb
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	Parte do rDNA 18S	19
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	Parte do rDNA 18S	21
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS1-5.8S-ITS2	19
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS1-5.8S-ITS2	20

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 20ng de DNA genômico; 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,4µM de cada *primer*; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão da enzima 1X (Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM); 1,25U da enzima *Taq* DNA polimerase e água Milli-Q autoclavada até o volume de 25µL. Foi realizada uma reação de controle negativo, na qual o DNA foi omitido.

As amplificações de DNA foram realizadas em termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems). O programa de amplificação do gene 18S das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e, finalmente, uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para amplificação da região ITS o programa foi de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e, finalmente, uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação (5µL da reação) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,4µg/mL) e fotodocumentados sob luz UV utilizando o *Fluor-S Multimager System* (BioRad).

### 3.5.3.2 Purificação dos fragmentos amplificados para seqüenciamento

Após a visualização dos fragmentos amplificados (20µL da reação) em gel de agarose especial 1% (*Low Melting Point Agarose* – GIBCO BRL), os mesmos foram purificados utilizando-se o Kit *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior seqüenciamento.

A purificação foi realizada recortando-se, com o auxílio de um bisturi, as bandas presentes no gel, as quais foram acondicionadas em tubos *ependorf* e adicionados 250µL de tampão de captura em cada amostra. Estas foram

homogeneizadas em vórtex, dissolvendo-se parcialmente o gel e colocadas a 60°C por 10 minutos até a completa dissolução do gel. Logo após, a mistura foi transferida para coluna GFX contendo um tubo coletor e centrifugada a 14.000 rpm por 30 segundos. Feita a centrifugação, foi descartada a alíquota do tubo coletor e adicionados 500µL de tampão de lavagem na coluna e novamente centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. As colunas foram transferidas para novos tubos *ependorf*, aos quais foram adicionados 40 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM) e deixado por 1 minuto a temperatura ambiente, até a completa diluição do DNA. Realizou-se a centrifugação dos tubos por 1 minuto a 14.000 rpm para resgatar os produtos de PCR purificados. Os fragmentos purificados foram visualizados e quantificados por eletroferese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,4µg/mL), comparando com o padrão molecular pGEM (15,38ng/µL – Applied Biosystems) e fotodocumentados sob luz U.V. Como padrão de peso molecular e tamanho do fragmento, foi usado o DNA λ clivado com a enzima *HindIII*.

### 3.5.3.3 Seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Os fragmentos purificados correspondentes às regiões ITS e parte do gene 18S, amplificados via PCR, foram utilizados para o seqüenciamento. As amostras foram preparadas pelo método de cadeia terminal dideoxi (ddNTP), segundo o protocolo *ABI Prism Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* (Applied Biosystems) em um volume final de 10µL, em que foram utilizados cerca de 100ng de DNA, 5pmoles de *primer*, 2µL de Big Dye (solução Kit), 2µL de tampão 2,5X (Tris-HCl 200mM pH 9,0; MgCl<sub>2</sub> 5mM) e água Milli-Q para o volume final de 10µL. As duas fitas de DNA correspondentes à região espaçadora (ITS) e as duas fitas correspondentes à região 18S foram seqüenciadas. As reações para o seqüenciamento foram conduzidas em termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 9700) com a seguinte

programação: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguido por 25 ciclos a 96°C por 45 segundos, 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Terminadas as reações de seqüenciamento, as amostras foram purificadas por um método de precipitação onde os ddNTP que não foram incorporados durante a síntese das moléculas de DNA são eliminados. O método foi realizado adicionando-se às amostras 10µL de água Milli-Q autoclavada e 30µL de isopropanol aos 10µL da reação. Após homogeneização por agitação em vórtex, incubou-se a solução durante 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a mesma foi centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta. Foram adicionados 250µL de etanol 70% em cada amostra e novamente centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. O etanol 70% foi completamente descartado das amostras e o precipitado foi incubado a 40°C por um período de 10 minutos, em bloco aquecedor para microtubos. Logo após, o material precipitado foi ressuspensionado em 10µL de Formamida (Hi-Di Formamide – Applied Biosystems) e as amostras de DNA foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 9700) e colocadas no gelo por 2 minutos, com a finalidade de manter as fitas de DNA abertas, antes de irem para o seqüenciador. A leitura das bases marcadas foi realizada por eletroforese em seqüenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser do Laboratório de Seqüenciamento do CENA/USP.

#### **3.5.3.4 Análise das seqüências**

Os resultados das seqüências obtidas foram alinhadas e submetidas a comparações utilizando o serviço do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI), usando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), comparando-as com as seqüências depositadas no GenBank.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

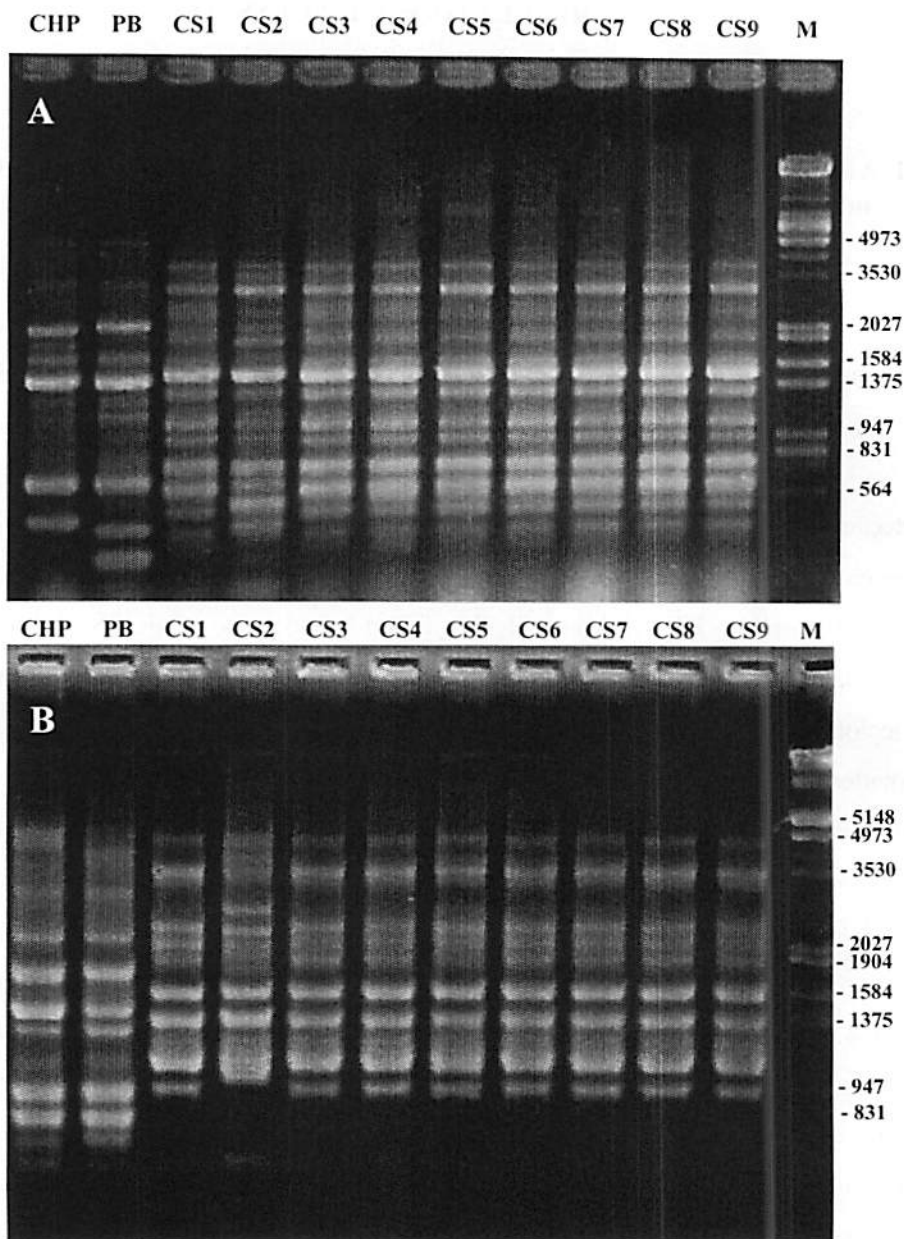
### 4.1 Análise da variabilidade genética de isolados de *Agaricus blazei* por meio de marcadores RAPD

A classe de marcadores RAPD permite identificar o grau de similaridade entre os genótipos de organismos de interesse. Neste estudo, foram analisados e comparados nove isolados comerciais de *A. blazei* e dois isolados de *A. bisporus*, os quais serviram como controle durante as análises moleculares.

Uma das limitações relacionadas à utilização da técnica está ligada à seleção de *primers* que serão empregados. É necessário que se teste um grande número de *primers* para, posteriormente, selecionar os que melhor detectem os polimorfismos de DNA. Neste trabalho, foram testados, no total 108 *primers*, dos quais 50 foram selecionados para análise de RAPD. Estes *primers* foram selecionados de acordo com a amplificação dos fragmentos de DNA em todos os isolados e por apresentarem bandas polimórficas níticas, facilmente detectadas a olho nu, uma vez que somente as bandas fortes foram consideradas para análise. Estes *primers* geraram um total de 445 bandas polimórficas, entre os isolados das duas espécies analisadas (*A. bisporus* e *A. blazei*) (Anexo A).

Considerando-se apenas os isolados de *A. blazei*, foram encontradas, no total, 139 bandas polimórficas em 46 *primers* analisados, obtendo-se uma média de três bandas polimórficas por *primer*. Entre os dois isolados de *A. bisporus* (CHP e PB) foi obtido um total de 78 bandas polimórficas em 39 *primers* analisados, com média de duas bandas polimórficas por *primer*. Na Figura 2 observa-se o padrão de bandas obtido com os *primers* OPAN-14 e OPAU-17, para os dois isolados de *A. bisporus* e para os nove isolados de *A. blazei*, revelando o polimorfismo entre as duas espécies do gênero *Agaricus* e do isolado CS2 em relação aos demais isolados de *A. blazei* analisados.



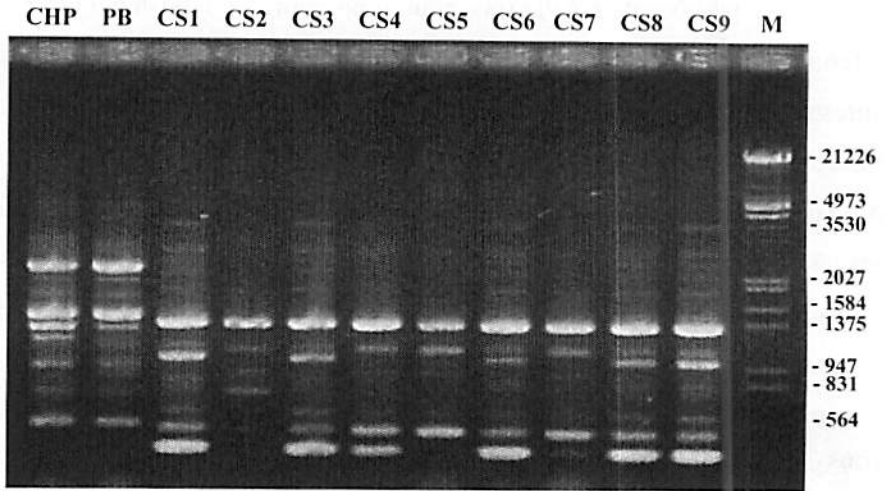


**FIGURA 2** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando padrões de RAPD obtidos com os 2 isolados de *Agaricus bisporus* (controle) e os 9 isolados de *A. blazei*. A e B mostram os padrões de RAPD utilizando os *primers* OPAN-14 e OPAU-17, respectivamente. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\lambda$ HindIII e EcoRI.

Os padrões de RAPD revelaram o polimorfismo existente entre as duas diferentes espécies de cogumelos analisadas, indicando que espécies distintas apresentam padrões de bandas bem diferentes. Além disso, foi possível discriminar isolados dentro da mesma espécie, como o isolado CS2 de *A. blazei*, o qual apresentou-se distinto em praticamente todos os *primers* analisados, em relação aos demais isolados de *A. blazei*. Isso confirma a alta capacidade discriminatória da técnica de RAPD em estudos de diversidade genética de fungos, sendo uma técnica útil na diferenciação de isolados de várias espécies de cogumelos comerciais (Khush et al., 1992; Chiu et al., 1995; Zhang & Molina, 1995; Chiu et al., 1996; Ito et al., 1998; Ramirez et al., 2001; Colauto et al., 2002).

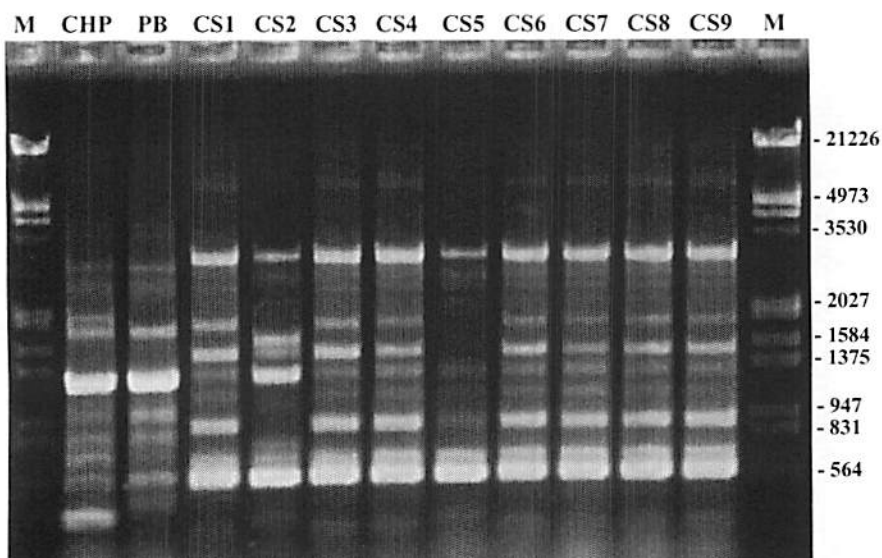
O isolado CS5 também apresentou divergência em relação aos demais isolados estudados. No entanto, somente os *primers* OPL-10, OPM-11, OPAN-18, OPAW-04, OPAW-16, OPAZ-04, OPAZ-12, OPAZ-16, OPAZ-18, OPAQ-06, OPAQ-10 e OPAT-20 é que foram capazes de discriminá-lo em relação aos demais. Isso também foi observado para o isolado CS7, no qual foi possível detectar polimorfismo com os *primers*: OPB-07, OPM-09, OPAQ-06, OPAQ-10, OPAT-20, OPAW-04 e OPAZ-16. A Figura 3 mostra os padrões de RAPD obtidos, utilizando-se o *primer* OPAQ-06, indicando o polimorfismo dos isolados CS2, CS5 e CS7 em relação aos demais isolados de *A. blazei*.

Ramirez et al. (2001), utilizando a técnica de RAPD para a diferenciação de isolados comerciais de *A. bisporus*, verificaram que, dos 66 *primers* utilizados para análise, somente 12 apresentaram polimorfismo, representando apenas 18% do total de *primers* analisados. Neste trabalho, dos 108 *primers* utilizados, 42% apresentaram polimorfismo entre os isolados de *A. blazei*. Resultados semelhantes foram encontrados por Colauto et al. (2002), ao analisarem também isolados de *A. blazei*, os quais encontraram polimorfismo em 8 dos 20 *primers* testados, representando 40% do total de *primers* utilizados.



**FIGURA 3** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando padrões de RAPD obtido com os isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei*, utilizando o *primer* OPAQ-06. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\lambda$ HindIII e *Eco*RI.

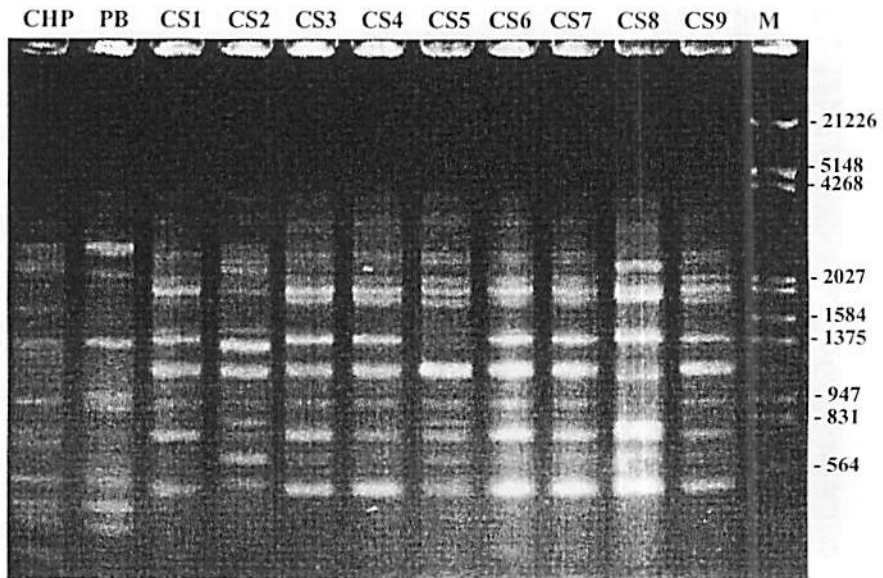
No isolado CS2 foram encontradas, no total, 53 bandas polimórficas, a partir de 34 *primers*, representando 38% do total de bandas polimórficas encontradas em todos os isolados de *A. blazei*. Estas bandas poderão, futuramente, ser isoladas e utilizadas como sondas ou para construção de *primers* específicos da espécie, facilitando, dessa forma, todo o processo de detecção e identificação da mesma. Assim como o CS2, o isolado CS5 também apresentou diferenças em relação aos demais isolados. A Figura 4 mostra os padrões de RAPD obtidos, utilizando-se o *primer* OPAW-16, no qual se verifica o polimorfismo nítido dos isolados CS2 e CS5 em relação aos demais isolados de *A. blazei*.



**FIGURA 4** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando padrões de RAPD obtido com os isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei*, utilizando o *primer* OPAW-16. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\lambda$ HindIII e EcoRI.

Zhang & Molina (1995), ao analisarem 15 isolados comerciais do cogumelo shiitake, verificaram que 13 deles se mostraram com padrões únicos de RAPD e somente 2 isolados apresentaram padrões idênticos em todos os sete *primers* analisados, indicando que estes dois isolados são, na verdade, cópias ou estão muito intimamente relacionados.

Neste trabalho, o isolado CS8 apresentou polimorfismo em um único *primer* (OPM-11) (Figura 5), enquanto que os demais isolados de *A. blazei* (CS1, CS3, CS4, CS6 e CS9) apresentaram padrões idênticos de RAPD em todos os *primers* analisados, indicando que os mesmos são muito próximos ou geneticamente idênticos e, possivelmente, clones de um mesmo indivíduo.

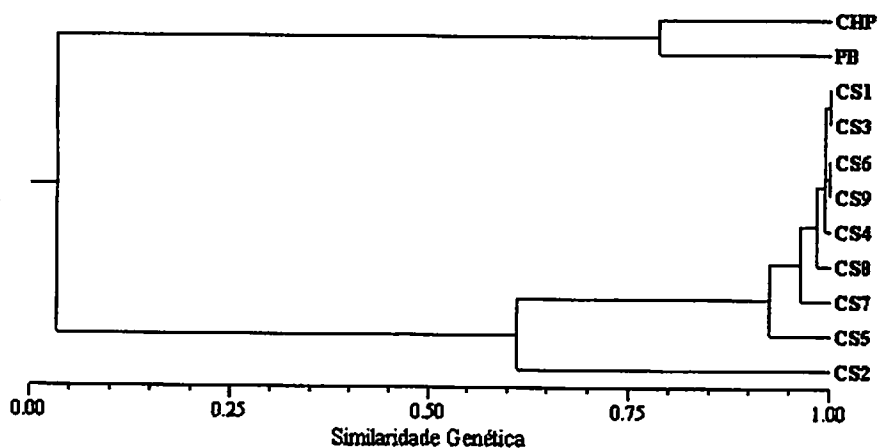


**FIGURA 5** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando padrões de RAPD obtido com os isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei*, utilizando o *primer* OPM-11. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\lambda$ HindIII e EcoRI.

Para os isolados de *A. blazei*, o número de fragmentos polimórficos de DNA amplificados de diferentes tamanhos, para cada *primer* analisado, variou de 0 a 9, com tamanhos variando de 300 a 4.268 pares de bases. Junghans et al. (1998), ao analisarem isolados do fungo basidiomiceto *Pisolithus tinctorius*, também por RAPD, encontraram fragmentos variando de 317 a 2.897 pb. Valores semelhantes foram encontrados por Zhang & Molina (1995) para a diferenciação de isolados do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*), os quais encontraram fragmentos de DNA variando de 340 a 2.520 pb. No entanto, os tamanhos dos fragmentos amplificados podem ser muito variáveis, dependendo da espécie e principalmente do *primer* utilizado.

O polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado que corresponde a uma banda no gel, está presente ou ausente (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Dessa forma, obtêm-se uma matriz de dados de 0 e 1, correspondentes aos vários genótipos e as várias bandas.

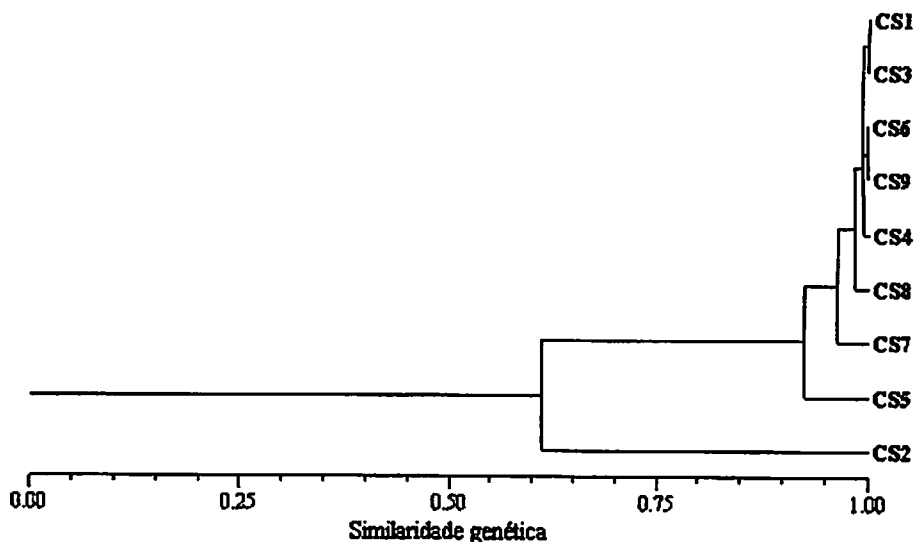
A análise combinada das 445 bandas polimórficas encontradas nos 11 isolados estudados (*A. bisporus* e *A. blazei*) permitiu a construção de um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice (Figura 6), que mostrou as relações de similaridade genética entre os isolados estudados. A Tabela 4 mostra a matriz de similaridade genética (%) entre os isolados de *A. bisporus* e *A. blazei*, construída com base nos padrões de RAPD. Considerando apenas os isolados de *A. blazei*, foi construído um segundo dendrograma (Figura 7), de acordo com os padrões de bandas encontrados nos 9 isolados analisados.



**FIGURA 6** Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei*, de acordo com os padrões de RAPD, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice.

**TABELA 4** Matriz de similaridade genética (%) entre os isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei*, analisados dois a dois, de acordo com os padrões de RAPD e baseada no coeficiente de Dice.

%	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
CHP	100										
PB	78	100									
CS1	3,8	3,3	100								
CS2	2,3	1,8	59	100							
CS3	3,8	3,3	100	59	100						
CS4	3,8	3,3	99	60	99	100					
CS5	3,4	2,3	92	65	92	92	100				
CS6	3,8	3,3	99	60	99	99	92	100			
CS7	3,8	3,4	96	62	96	96	94	96	100		
CS8	3,7	3,3	98	60	98	98	91	98	95	100	
CS9	3,8	3,3	99	60	99	99	92	100	96	98	100



**FIGURA 7** Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de *Agaricus blazei*, de acordo com os padrões de RAPD, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice.

Verifica-se, na Figura 6, a formação de dois grupos distintos, o primeiro agrupando os isolados de *A. bisporus* e o segundo agrupando os isolados de *A. blazei*, o que já era esperado, uma vez que são de espécies distintas, apresentando um baixo grau de similaridade genética (média de 3%).

O dendrograma formado apenas pelos isolados de *A. blazei* (Figura 7) também permitiu o agrupamento diferenciado entre os mesmos, indicando possíveis divergências genéticas entre eles. Adotando-se uma linha arbitrária a 98% de similaridade, foi observada a formação de quatro grupos distintos. O primeiro grupo foi formado pelos isolados CS1, CS3, CS4, CS6, CS8 e CS9, os quais apresentaram similaridade genética superior a 98%, sendo que os pares de isolados CS1 e CS3, CS6 e CS9, apresentaram 100% de similaridade, sendo, portanto, geneticamente idênticos, apesar de serem procedentes de locais diferentes do país (Tabela 1).

Os isolados CS7 (Porto Alegre, RS), CS5 (Araçatuba, SP) e CS2 (Belo Horizonte, MG) formaram grupos distintos, apresentando níveis de similaridade genética abaixo de 96%, com médias de 91,3%, 88,7% e 60,6%, respectivamente. De todos eles, o isolado CS2 foi o que apresentou a maior divergência genética em relação aos demais, apresentando similaridade variando de 59% (CS1 e CS3) a 65% (CS5) (Tabela 4). Portanto, não se observou uma correlação entre similaridade genética e origem dos isolados, uma vez que a maior distância genética (ou menor similaridade genética) foi observada entre isolados de mesma procedência (CS2 e CS3, ambos de BH), como também procedentes de locais diferentes do país (CS2 e CS1, procedentes de BH, MG e Vitória, ES, respectivamente). Observa-se também que isolados obtidos de diferentes regiões do país (CS1, CS3, CS6, CS9, CS4 e CS8) apresentaram uma alta similaridade genética, suportando a idéia de que eles poderiam ter uma origem ou um ancestral em comum. No entanto, é importante ressaltar que os isolados analisados no presente estudo, mesmo tendo sido coletados em regiões



diferentes do país, não foram obtidos na natureza, mas sim de cultivos comerciais, podendo, alguns deles, terem sido fornecidos por uma mesma empresa.

Lana (2004), por meio da técnica de RAPD, verificou que isolados geneticamente semelhantes do fungo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* colonizam plantas de cacau cultivadas em áreas geograficamente diferentes, sugerindo que possa existir uma disseminação clonal desse patógeno.

Em vários outros trabalhos utilizando a técnica de RAPD, em diferentes fungos, também não foi possível estabelecer uma relação entre a similaridade genotípica e ou polimorfismo encontrado e a origem geográfica dos isolados (Zimand et al., 1994; Frazzon et al., 2002; Góes et al., 2002; Santos et al., 2002; Almeida et al., 2003; Tigano et al., 2003; Lana, 2004; Teixeira et al., 2004). No entanto, Junghans et al. (1998) verificaram que a grande diversidade genética encontrada em isolados do fungo *Pisolithus tinctorius*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, Estados Unidos e França, estava diretamente relacionada com a sua origem geográfica, sendo que a maior distância genética foi obtida entre pares de isolados de procedências geográficas mais distantes.

Colauto et al. (2002), caracterizando cinco isolados do cogumelo *A. blazei* também por análise de RAPD, verificaram que três deles (ABL 97/11, ABL 99/25, ABL 99/29) não apresentaram qualquer divergência, sendo caracterizados como isolados de uma mesma origem, apesar de terem sido obtidos de locais diferentes do país. Outros dois isolados mostraram-se diferentes do primeiro grupo e divergentes entre si, com similaridade genética de 78% (ABL 99/26) e 92% (ABL 99/28) em relação ao primeiro grupo. Os mesmos autores, considerando que esses isolados tenham uma origem em comum, acreditam que essa diferença, encontrada nos dois últimos isolados, possa ter sido ocasionada pelo processo de recombinação genética e ou mutação que teria ocorrido naturalmente gerando variabilidade genética entre os mesmos.

Os resultados encontrados por Colauto et al. (2002), no entanto, contradizem com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que foi encontrada uma divergência genética de 6% entre os isolados CS5 (ABL 99/25) e CS7 (ABL 99/29). O isolado CS9, que seria correspondente ao isolado ABL 99/26, porém proveniente da cidade de Elói Mendes, MG e não da coleção da UNESP/FCA de Botucatu, SP, também apresentou resultados diferentes aos encontrados por Colauto et al. (2002), os quais verificaram ser o isolado mais divergente. No entanto, o isolado CS9 não apresentou divergência significativa em relação à maioria dos isolados estudados neste trabalho, verificando que o mesmo apresentou 99% de similaridade com os isolados CS1, CS3 e CS4 (ABL 97/11) e 100% de similaridade com o isolado CS6. Esses resultados podem indicar que houve um equívoco do produtor de Elói Mendes, MG, que forneceu os basidiocarpos desse isolado (CS9), ao apontar a origem do mesmo como sendo o *A. blazei* Jun-17 (ABL 99/26).

Os resultados obtidos no presente trabalho, com relação aos isolados CS5 (ABL 99/25) e CS7 (ABL 99/29), que contrapõem-se aos resultados obtidos por Colauto et al. (2002), podem ser justificados, uma vez que um pequeno número de *primers* (8 *primers*) e isolados foi utilizado por estes autores, não encontrando nenhuma divergência genética entre eles. Contudo, os mesmos autores recomendaram que estudos adicionais deveriam, ainda, ser realizados utilizando-se um maior número de *primers* e também novos isolados, com o intuito de avaliar melhor a variabilidade genética da espécie *A. blazei*. Portanto, no presente estudo, utilizando um maior número de *primers*, foram detectadas algumas diferenças entre os isolados CS5 e CS7 de *A. blazei*, os quais apresentaram uma similaridade genética de 94%.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que alguns isolados vendidos como inoculantes pelas diferentes empresas (CS1, CS3, CS4, CS6, CS8 e CS9) apresentam características genotípicas muito próximas, sendo,

provavelmente, clones, apresentando uma origem em comum. A princípio, a produção de inoculante e composto colonizado estava concentrada no estado de São Paulo, de onde eram enviados para vários estados, como Minas Gerais, Espírito Santo e Brasília, entre outros (Dias, 2005 - comunicação pessoal). Acredita-se que a grande maioria dos isolados utilizados comercialmente seja originária da região de Piedade, SP, de onde se espalharam para vários outros locais do país. No entanto, ressalta-se, ainda, que os isolados analisados no presente estudo, mesmo tendo sido coletados em regiões diferentes do país, não foram obtidos na natureza, mas sim de cultivos comerciais, podendo, alguns deles, terem sido fornecidos por uma mesma empresa, apresentando, dessa forma, uma alta similaridade genética.

Os resultados obtidos mostraram que os isolados CS7, CS5 e, principalmente, o CS2 são geneticamente divergentes em relação aos demais e isso provavelmente pode ter sido ocasionado pelo processo de recombinação genética ou mutação, que são as fontes de variabilidade genética que podem ocorrer naturalmente entre os organismos vivos. Outros autores também sugerem estes dois fenômenos como causa da variabilidade genética encontrada entre isolados comerciais de *A. bisporus* (Ramirez et al., 2001) e também em isolados de *A. blazei* (Colauto et al., 2002).

Um estudo sobre a variabilidade genética entre isolados do cogumelo *A. bisporus*, detectada com o uso de marcadores RAPD, demonstrou a existência de grande polimorfismo naqueles coletados no campo e a pequena base genética nas cultivares comerciais (Krush et al., 1992). Os autores concluíram que esses dados foram semelhantes aos obtidos com marcadores RFLP e isoenzimas, com a vantagem dos marcadores RAPD produzirem resultados rápidos e permitirem a análise de muitos locos em poucos ensaios.

A grande diversidade genética encontrada entre os isolados do fungo *Hebeloma cylindrosporum*, coletados de uma área geográfica restrita, foi

atribuída à intensa taxa de reprodução sexual cruzada dentro dessa espécie (Marmeisse et al., 1992). Outros trabalhos também apontaram a reprodução sexual como sendo a causa do grande polimorfismo genético entre isolados de fungos (Hulbert & Michelmore, 1988; Junghans et al., 1998; Milgroom et al., 1992).

Em fungos da divisão Basidiomycota, a reprodução sexual envolve as etapas de plasmogamia, cariogamia e meiose, resultando na formação dos basidiósporos (Deacon, 1997). Em espécies heterotálicas, este processo ocorre quando hifas monocarióticas geneticamente compatíveis se fundem (plasmogamia), formando o dicarioto (hifa que contém dois núcleos diferentes), o qual é capaz de produzir o corpo de frutificação (basidiocarpo ou cogumelo). Neste são formadas células especiais chamadas basídios, nas quais os dois núcleos se fundem (cariogamia), seguindo-se a meiose para a formação dos esporos sexuais (basidiósporos). Nas espécies homotálicas, esporos individuais uninucleados e haplóides germinam, produzindo uma hifa que é capaz de produzir corpos de frutificação. Portanto, os esporos são autoférteis (Alexopoulos et al., 1996). No entanto, nada se pode inferir a respeito dos mecanismos que levam à recombinação genética em *A. blazei*, uma vez que o ciclo sexual desta espécie ainda é pouco conhecido.

A mutação espontânea resulta de alterações do material genético por erros que ocorrem na duplicação normal do ácido nucléico. Esses erros podem surgir por substituições ou, ainda, por inserções ou perdas de bases nitrogenadas no DNA, sem que haja um mecanismo de reparo destas modificações (Azevedo, 1998). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), o polimorfismo detectado pela técnica de RAPD resulta de mutações de ponto os quais são suficientes para causar a não complementariedade do *primer* com o sítio de iniciação e, assim, impedir a amplificação de um segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de

iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer.

Dessa forma, verifica-se que o grande polimorfismo presente no isolado CS2, possivelmente, está relacionado com essas modificações no seu DNA, ocasionadas por mutações ou por processos de recombinação. Segundo Eira (2003), a utilização de meios de cultura muito ricos e completamente diferentes dos substratos de cultivo, além de repicagens sucessivas da cultura fúngica, podem levar à seleção de mutantes auxotróficos, com possíveis alterações simultâneas de outras características da fungicultura. A ocorrência de mutações involuntariamente obtidas pode comprometer algumas características importantes, como a morfologia e a composição farmacológica e nutricional dos cogumelos. Portanto, outros estudos deverão ser conduzidos, com o intuito de se avaliar tais características.

Outros trabalhos também têm sido realizados no Departamento de Biologia, no setor de Microbiologia Agrícola da UFLA, visando o melhor entendimento sobre as características fisiológicas, citológicas, nutricionais e enzimáticas dos isolados do cogumelo *A. blazei*. Labory (2003), em estudos sobre os aspectos citológicos e condições de crescimento do *A. blazei*, utilizando os mesmos isolados, verificou que o isolado CS2 apresentou o menor número de núcleos por célula (média de 5,34) e também as menores dimensões celulares, como comprimento (49,20 $\mu\text{m}$ ), largura (4,38 $\mu\text{m}$ ) e, conseqüentemente, a menor área celular (215,50 $\mu\text{m}^2$ ), em relação aos demais isolados. Os isolados CS5 e CS7 também apresentaram menores dimensões celulares em relação aos demais isolados, apresentando valores de 331,25 $\mu\text{m}^2$  e 303,60 $\mu\text{m}^2$ , respectivamente. No entanto, não foi observada, para os isolados de *A. blazei*, uma correlação positiva entre o número de núcleos e área celular, uma vez que isolados que apresentaram grande número de núcleos por célula apresentaram também dimensões celulares bastante reduzidas, destacando-se, neste caso, o isolado

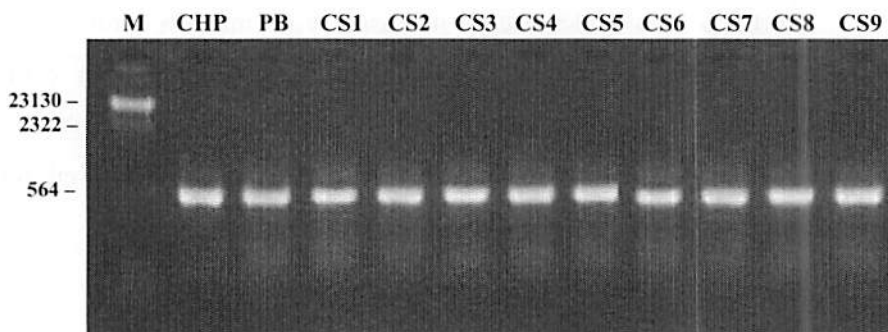
CS7, o qual apresentou o maior número de núcleos por compartimento celular (média de 6,12). Em relação às condições de crescimento, de maneira geral, o isolado CS2 também foi um dos isolados que apresentaram os menores desempenhos em relação ao crescimento micelial, o qual foi avaliado em diferentes meios de cultura, sob diferentes níveis de pH, não apresentando, neste último, diferenças significativas em nenhum dos meios testados.

O trabalho realizado por Gaspar Jr. (2003) sobre a caracterização enzimática de isolados de *A. blazei* evidenciaram uma diferença de atividade da celulase entre os isolados, tendo o CS2 e CS6 apresentado os menores picos de atividade de exo e endoglucanase. No entanto, para  $\beta$ -glicosidade, os mesmos isolados apresentaram a maior atividade em relação aos demais. Segundo o autor, esses resultados indicam que os isolados estudados poderiam ser separados em dois ou três grupos, segundo a sua capacidade de utilização da celulose.

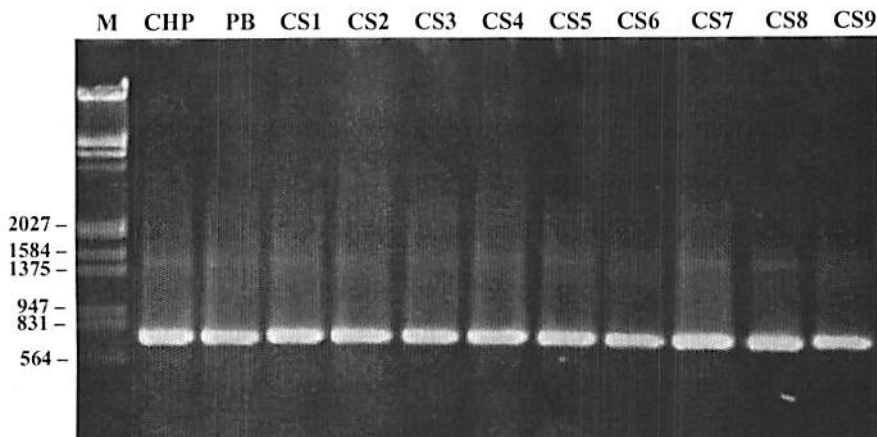
Estes resultados confirmam que o isolado CS2 é realmente distinto dos demais, tanto nos aspectos citológicos, fisiológicos e enzimáticos, provavelmente relacionados com as diferenças genéticas reveladas pela técnica de RAPD. Portanto, fica evidenciada a necessidade de maiores estudos com relação a este isolado, acerca das características agrônômicas tais como produtividade, cor e tamanho do cogumelo, bem como das suas propriedades medicinais, para verificar o seu potencial para ser utilizado futuramente em um programa de melhoramento genético da espécie.

## 4.2 Análise do rDNA

Os produtos de PCR obtidos da amplificação de parte do gene 18S, utilizando os *primers* NS1/NS2, produziram um único fragmento de aproximadamente 550 pares de bases em todos os isolados analisados (Figura 8), não mostrando polimorfismo em relação ao tamanho do fragmento amplificado. A região ITS do rDNA, que compreende os espaçadores ITS1 e ITS2, incluindo a subunidade 5.8S do rDNA, também apresentou amplificação em todos os isolados. Os produtos resultantes da amplificação da região ITS, utilizando os *primers* ITS1/ITS4, também não mostraram diferença quanto ao tamanho, apresentando um único fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (Figura 9). Esses fragmentos amplificados foram posteriormente clivados com diferentes enzimas de restrição para análise de RFLP e também foram seqüenciados e alinhados e comparados com outras seqüências depositadas no GenBank.



**FIGURA 8** Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% de parte do gene 18S do rDNA dos isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei* amplificados com os *primers* NS1/NS2. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\lambda$  clivado com *HindIII*.



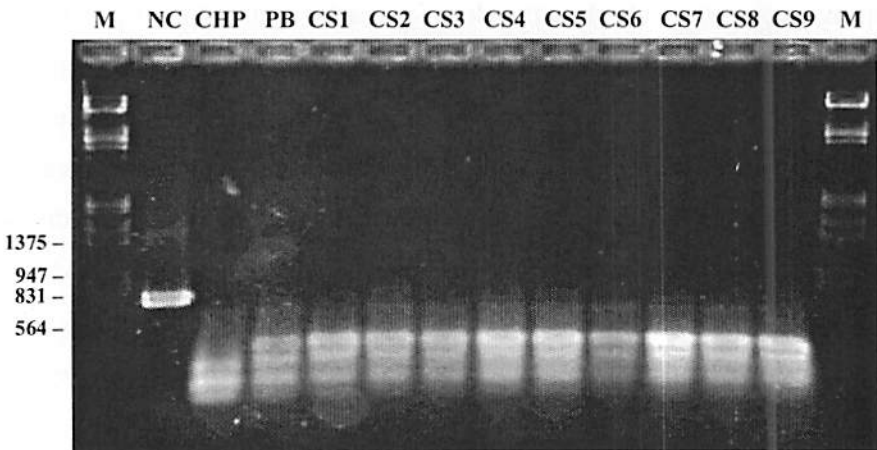
**FIGURA 9** Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% da região ITS do rDNA dos isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei* amplificados com os *primers* ITS1/ITS4. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\lambda$  clivado com *Hind*III e *Eco*RI.

Neste trabalho, a amplificação da região ITS resultou em um fragmento de aproximadamente 700 pb, em todos os isolados analisados, o que está de acordo com os tamanhos descritos para a espécie *A. blazei*, que apresenta entre 711 e 712 pb e para a espécie *A. bisporus*, que apresenta 702 pares de bases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; Kerrigan, 2005). Tamanhos parecidos também foram encontrados em outras espécies de fungos da divisão Basidiomycota. Gomes et al. (1999), estudando a região ITS do rDNA de 19 isolados do fungo *Pisolithus* spp., encontraram tamanhos variando entre 640 e 750 pb. Valores semelhantes também foram encontrados em trabalhos com outros fungos ectomicorrízicos (Karén et al., 1997; Gomes et al., 2002). Para a determinação do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição, foram utilizadas, neste trabalho, as seguintes enzimas de restrição: *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Alu*I, *Cfo*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Hin*fI, *Hae*III, *Bgl*II, *Bam*HI, *Xba*I, *Pst*I, *Dra*I e *Xmn*I. Nenhum sítio de restrição foi encontrado dentro da

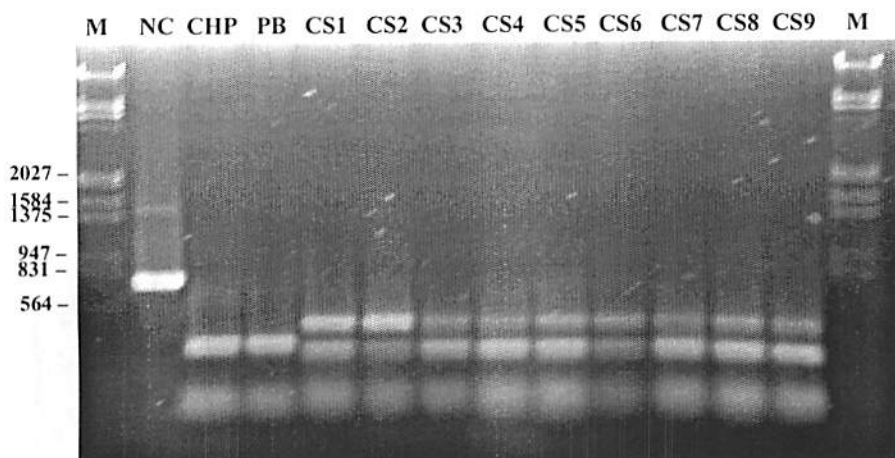


região ITS, utilizando-se as enzimas *Xba*I, *Dra*I, *Eco*RV, *Bgl*III, *Rsa*I, *Bam*HI, *Msp*I, *XMn*I e *Pst*I. As enzimas *Cfo*I, *Eco*RI e *Hae*III, apesar de encontrarem seus sítios de restrição dentro da região ITS, não apresentaram polimorfismo no tamanho dos seus fragmentos, não sendo capazes, portanto, de discriminar as duas espécies do gênero *Agaricus* nem os isolados dentro da mesma espécie. A enzima *Hin*fI, que corta seqüências de 4 pb, foi capaz de discriminar o isolado CHP do isolado PB de *A. bisporus*, revelando o polimorfismo intra-específico desta espécie. No entanto, não conseguiu discriminar o isolado PB de *A. bisporus* dos demais isolados de *A. blazei* (Figura 10).

A clivagem da região ITS com a enzima *Alu*I, que também corta seqüências de 4 pb, permitiu a diferenciação entre as duas espécies (*A. bisporus* de *A. blazei*) mas, não permitiu a diferenciação entre os isolados da mesma espécie (Figura 11).



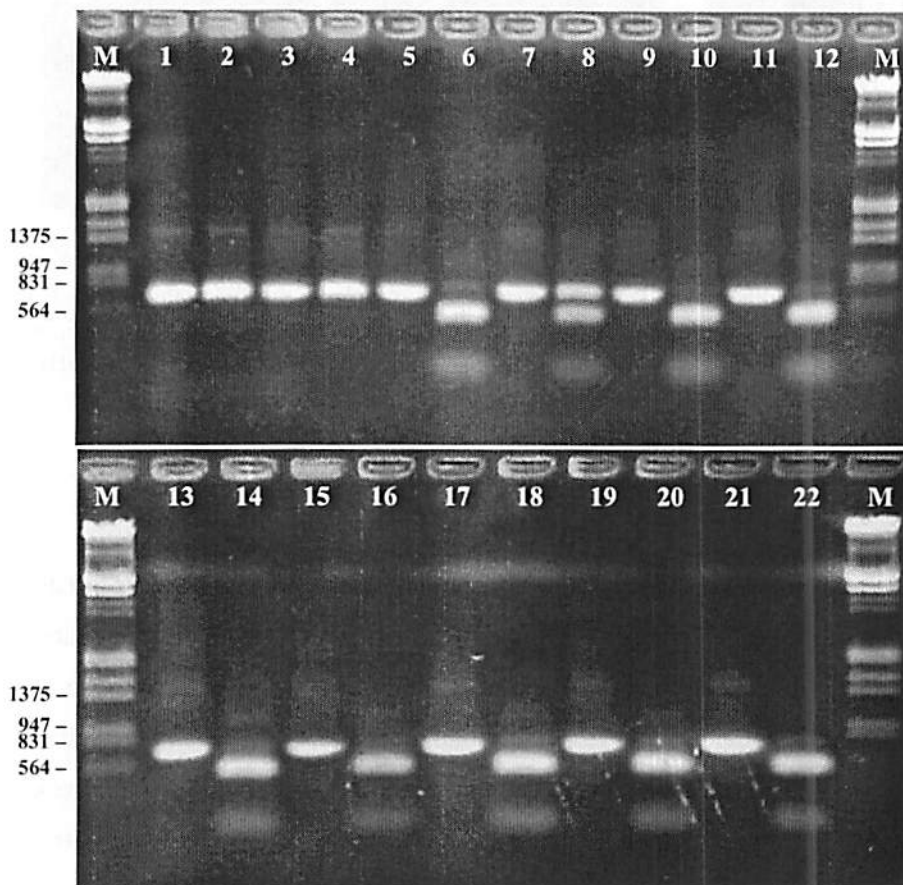
**FIGURA 10** Padrão de restrição da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei* amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Hin*fI. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\mathcal{N}$ *Hind*III e *Eco*RI. NC – DNA antes da digestão (não clivado).



**FIGURA 11** Padrão de restrição da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei* amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *A*luI. M – Marcador de peso molecular (pb) - DNA  $\lambda$ HindIII e *E*coRI. NC – DNA antes da digestão (não clivado).

Estes resultados indicam que a região ITS, nesses organismos, apresenta um relativo grau de polimorfismo interespecífico, sendo, no entanto, bastante conservada dentro das espécies. Alves et al. (2005), em análise de restrição da região ITS, também observaram o baixo polimorfismo intra-específico encontrado em isolados do fungo ascomiceto *Botryosphaeria* spp. Esse baixo polimorfismo intra-específico da região ITS também já foi observado por outros autores, em *Macrophomina phaseolina* (Almeida et al., 2003), *Paecilomyces fumosoroseusem* (Azevedo et al., 2000), *Scytalidium thermophilum* (Lyons et al., 2000), *Crinipellis pernicioso* (Lana, 2004), *Tylospora fibrillosa* (Erland et al., 1994) e em outros fungos ectomicorrízicos (Gardes et al., 1991; Gomes et al., 2002).

A enzima *Hind*III, que corta seqüências de 6 pb, também permitiu discriminar as duas espécies analisadas, na qual se verifica a ausência do sítio de restrição desta enzima, dentro da espécie *A. bisporus* (Figura 12).



**FIGURA 12** Padrão de restrição da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA, de isolados de *Agaricus bisporus* e *A. blazei*, amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Hind*III. M – Marcador (pb) - DNA  $\lambda$ *Hind*III e *Eco*RI; 1/2 - CHP; 3/4 - PB; 5/6 - CS1; 7/8 - CS2; 9/10 - CS3; 11/12 - CS4; 13/14 - CS5; 15/16 - CS6; 17/18 - CS7; 19/20 - CS8 e 21/22 - CS9. Colunas ímpares – DNA antes da digestão. Colunas pares – DNA após digestão de restrição.

A enzima *Hind*III também revelou polimorfismo no isolado CS2 da espécie *A. blazei* em relação aos demais isolados estudados. Observou-se que os demais isolados apresentaram dois fragmentos de restrição após a digestão, enquanto que o isolado CS2 apresentou três fragmentos, sendo o primeiro de tamanho igual ao fragmento não clivado (~700 pb), indicando uma digestão parcial do fragmento amplificado (Figura 12). A formação desses três fragmentos, provavelmente, ocorreu devido a um polimorfismo dentro das unidades de repetição do rDNA, indicando a ocorrência de uma possível mutação no sítio de restrição desta enzima. A análise foi repetida por mais quatro vezes, com diferentes tempos de incubação (3 horas e 13 horas) e concentração da enzima, para verificar se esta digestão parcial do fragmento ITS amplificado pudesse ter sido ocasionada pelo pouco tempo de digestão da enzima. No entanto, as análises foram consistentes, sendo o perfil de restrição obtido semelhante em todas as repetições.

Portanto, pode-se sugerir que realmente ocorreu uma mutação no sítio de restrição desta enzima. Isso pode ser explicado pelo fato de ser o rDNA repetitivo, o qual apresentou mutação em determinados sítios dentro da região ITS, em algumas das unidades de repetição, fazendo com que a enzima não mais reconhecesse o seu sítio de restrição em algumas das regiões repetitivas. Estes resultados corroboram com a diferença detectada pela técnica de RAPD, na qual mostrou o isolado CS2 ser geneticamente diferente e o mais divergente em relação aos demais isolados de *A. blazei* estudados.

O fragmento amplificado correspondente à região ITS também foi purificado e seqüenciado nas duas direções (5' – 3' e 3' – 5'), utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4. No entanto, não foi possível o seqüenciamento total desta região para a maioria dos isolados, uma vez que a montagem do seqüenciamento, realizado nas duas direções, revelou um alto conteúdo de erros. Isto pode ter sido ocasionado, provavelmente, devido à baixa especificidade do

*primer* na temperatura de anelamento utilizada, que foi de 50°C, ou a quantidade de DNA utilizado ou também a quantidade de Big Dye utilizado, os quais poderiam estar interferindo diretamente na qualidade do seqüenciamento. Suspeitando-se de que fosse algum desses fatores, tal procedimento foi repetido, alterando-se a concentração do DNA, a temperatura de anelamento e a quantidade de Big Dye. No entanto, o seqüenciamento novamente acusou erros, que impossibilitaram o seqüenciamento completo desta região. Somente para alguns isolados (CHP, PB, CS1, CS2, CS5 e CS9) é que foi possível obter o seqüenciamento dessa região, apesar de ter ocorrido muita perda de informações nas extremidades da região ITS. No entanto, o alinhamento dessas seqüências (Anexo B) permitiu a comparação entre os isolados que foram seqüenciados, verificando diferenças nas seqüências das duas espécies analisadas (*A. bisporus* e *A. blazei*). Entretanto não foram encontradas diferenças nas seqüências entre os isolados da mesma espécie.

Estes resultados mostram a importância de se avaliar toda a seqüência do rDNA, em especial a região ITS de *A. blazei*, visto que a variabilidade genética nesta região parece ser reduzida nesta espécie. Portanto, torna-se necessário um novo seqüenciamento da região ITS, principalmente do isolado CS2 de *A. blazei*, para tentar identificar o ponto de mutação que deu origem ao polimorfismo parcial com a enzima *HindIII*, detectado por meio da técnica de PCR-RFLP (Figura 12).

As seqüências obtidas pelo seqüenciamento foram submetidas à comparações utilizando o serviço do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), comparando-as com outras seqüências depositadas no GenBank. Todas as seqüências avaliadas apresentaram alta homologia com as espécies estudadas (*A. bisporus* e *A. blazei*), mostrando que os isolados utilizados no presente trabalho são de fato da espécie de interesse. Os resultados identificaram as seis seqüências como

pertencentes à espécie *A. bisporus* strain RWK1737 (CHP e PB) e à espécie *A. blazei* strain SA514 (CS1, CS2, CS5 e CS9) correspondentes à região ITS, com índices de 99% e 97% de similaridade, respectivamente.

Os isolados também foram examinados com relação ao gene ribossomal 18S e as análises de polimorfismos e seqüenciamento parcial deste gene não revelaram diferenças que pudessem separar nem mesmo as espécies *A. blazei* de *A. bisporus* (Anexo C). Segundo alguns autores, a região 18S é muito conservada e, por isso, tem sido utilizada, em fungos, para estabelecer relações filogenéticas entre organismos mais distantes (Berbee & Taylor, 1992; Hopple Jr. & Vilgalys, 1999; Binder & Hibbett, 2002; Wanderlei-Silva et al., 2003). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que, apesar de conservados, os fragmentos amplificados da seqüência correspondente à subunidade menor 18S contêm regiões conhecidas por sua variabilidade e capacidade de distinção entre espécies de fungos (Maiwald et al., 1994; Kim et al., 1999; Nascimento & Martinez-Rossi, 2001; Destéfano, 2003). Outras regiões, como o gene 28S, apesar de muito conservado, também podem apresentar algumas variações para a comparação de diferentes gêneros e, até mesmo, de diferentes espécies (Bunyard et al., 1995 e 1996; Gargas & Depriest, 1996). Já o gene 5S é menos conservado e como tal, pode mudar mais rapidamente com o tempo, adquirindo mais variações (Bunyard et al., 1996).

Assim como a região ITS do rDNA, outras regiões localizadas entre os genes, e que não são transcritas, como a região IGS, caracterizam-se por apresentar um elevado grau de variações inter e intra-específicas (Herion et al., 1992; Lewin, 2001; Otero et al., 2004). Além de análises no rDNA, o mtDNA também se caracteriza por apresentar características importantes, que o fazem um marcador extremamente útil em estudos de taxonomia, variação intra-específica e relações filogenéticas de populações ou isolados com características próximas (Watson et al., 1987; Bruns et al., 1991; Kim et al.,

1992 e 1993), podendo ser uma ferramenta útil, também em estudos de variabilidade genética da espécie *A. blazei*. Portanto, outras regiões genômicas que apresentem um maior polimorfismo precisam ser identificadas e analisadas para melhor avaliar a diversidade genética desta espécie.

## 5 CONCLUSÕES

A técnica de RAPD permitiu verificar a elevada similaridade genética existente entre os isolados CS1, CS3, CS4, CS6, CS8 e CS9 de *A. blazei*, indicando que os mesmos são proximamente relacionados ou possivelmente clones, sendo considerados isolados de uma mesma origem.

Os isolados CS2, CS5 e CS7 de *A. blazei* apresentaram divergência genética em relação aos demais isolados analisados, sendo o isolado CS2 o mais divergente geneticamente, apresentando, em média, apenas 60% de similaridade genética em relação aos demais isolados de *A. blazei* analisados.

Pela técnica de PCR-RFLP, foi verificada a existência de um baixo polimorfismo intra-específico da região ITS do rDNA entre os isolados de *A. blazei*.

As enzimas de restrição *AluI* e *HindIII* revelaram o polimorfismo interespecífico da região ITS do rDNA entre as espécies *A. bisporus* e *A. blazei*, também revelada pelo seqüenciamento da mesma.

O isolado CS2 de *A. blazei* apresentou uma mutação no sítio de restrição da enzima *HindIII* dentro de algumas repetições da região ITS do seu rDNA.

De acordo com o seqüenciamento parcial e a análise de restrição das espécies analisadas, o gene 18S se mostrou muito conservado, apresentando ausência de polimorfismo inter e intra-específico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: J. Wiley, 1996. 866 p.

ALMEIDA, A. M. R.; ABDELNOOR, R. V.; ARIAS, C. A. A.; CARVALHO, P.; JACOUD FILHO, D. S.; MARIN, S. R. R.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; CARVALHO, C. G. P. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 279-285, maio/jun. 2003.

ALVES, A.; PHILLIPS, A. J. L.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 2, p. 221-229, Apr. 2005.

AMAZONAS, M. A. L. de A. *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.): última visão sobre a polêmica questão da identidade taxonômica de um dos cogumelos mais promissores no mercado mundial. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília. 2004, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, 2004. p. 78-80. (Documentos, 116).

AMAZONAS, M. A. L. de A.; SIQUEIRA, P. **Champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis*): ciência, saúde e sabor**. Colombo, 2003. 45 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 85).

ANDERSON, I. C.; CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. G. ITS-RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forest. **Mycological Research**, Cambridge, v. 11, n. 11, p. 1304-1312, Nov. 2001.

AUFAVRE-BROWN, A.; COHEN, J.; D. W. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers to Distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 11, p. 2991-2993, Nov. 1992.

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMES, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus*

(Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 729-732, out./dez. 2000.

AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: UFG, 1998. 490 p.

BERBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *Biosystems*, Clare, v. 28, n. 1/3, p. 117-125, 1992.

BERBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 73, p. 677-683, 1995. Supplement.

BINDER, M.; HIBBETT, D. S. Higher-level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, San Diego, v. 22, n. 1, p. 76-90, Jan. 2002.

BRAGA, G. C.; EIRA, A. F. **Cultivo de cogumelo do sol**. Viçosa: CPT, 1997. 60 p.

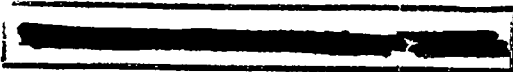
BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G.; COLAUTO, N. B. **Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murrill "Cogumelo-do-Sol"**. Botucatu, SP: FEPAF, UNESP/FCA, 1998. 44 p.

BRASILEIRO, B. T. R. V.; COIMBRA, M. R. M.; MORAIS JR, M. A. de; OLIVEIRA, N. T. de. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 205-210, July/Sept. 2004.

BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology Systematic*, Palo Alto, v. 22, p. 525-564, 1991.

BUNYARD, B. A.; NICHOLSON, M. S.; ROYSE, D. J. Phylogenetic of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology*, San Diego, v. 20, n. 4, p. 243-253, Dec. 1996.

BUNYARD, B. A.; NICHOLSON, M. S.; ROYSE, D. J. Phylogenetic resolution of *Morchella*, *Verpa*, and *Disciotis* (Pezizales: Morchellaceae) based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Experimental Mycology*, San Diego, v. 19, n. 3, p. 223-233, Sept. 1995.

  
CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 42, n. 2/3, p. 189-200, Aug./Sept. 1993.

CALVO-BADO, L. A.; CHALLEN, M. P.; THURSTON, C. F.; ELLIOTT, T. J. RAPD characterisation of heterogeneity in spore progenies and sexuality in the genus *Agaricus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 3, p. 370-376, Mar. 2001.

CAMARGO JUNIOR, 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, MG.

CARBONE, I.; KOHN, L. Ribossomal DNA sequence divergence within transcribed spacer 1 of the sclerotiniaceae. **Mycologia**, New York, v. 85, n. 3, p. 415-427, May/June 1997.

CHIU, S. W.; CHEN, M.; CHANG, S. T. Differentiating homothallic *Volvariella* mushroom by RFLPs and AP-PCR. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 3, p. 333-336, Mar. 1995.

CHIU, S. W.; MA, A. M.; LIN, F. C.; MOORE, D. Genetic homogeneity of cultivated strains of Shiitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 11, p. 1393-1399, Nov. 1996.

COLAUTO, N. C.; DIAS, E. S.; GIMENES, M. A.; EIRA, A. A. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 131-133, Apr./June 2002.

DEACON, J. W. **Modern mycology**. 3. ed. Cambridge: University Cambridge, 1997. 303 p.

DESTÉFANO, R. H. R. Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos. 2003. 72 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

DIAS, E. S.; LABORY, C. R. G.; SILVA, R. Cultivo de cogumelos comestíveis. Lavras, MG: FAEPE/DBI/UFLA, 2002. 50 p.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 134-150, Feb. 2000.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo Medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al).** Viçosa-MG. Ed. Aprenda Fácil, 2003. 398 p.

EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais: situação atual e perspectivas para o Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NA ALIMENTAÇÃO: saúde, tecnologia e meio ambiente no Brasil, 1., 2002, Brasília. **Anais...** Brasília, DF, 2002. p. 42-70. (Documentos, 88).

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis: modulo de cogumelos.** 2. ed. Botucatu: FEPAF-Unesp, 1997. 115 p.

ERLAND, S.; HERION, B.; MARTIN, F.; GLOVER, L. A.; ALEXANDER, I. J. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrilosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, n. 3, p. 525-532, Mar. 1994.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of 5. 8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, n. 1, p. 329-337, Jan. 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN /Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 1998. 220 p.

FIERRO, F.; MARTIN, J. F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 25, n. 1, p. 1-17, Jan. 1999.

FOULY, H.; WILKINSON, H. T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 4, p. 590-597, July/Aug. 1997.

FRAZZON, A. P. G.; MATSUMURA, A. T. S.; VAN DER SAND, S. T. Morphological characterization and genetic analysis of *Drechslera teres* isolates. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 235-241, June 2002.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 14, p. 12-16, maio/jun. 2000.

GALVÃO, C. Identificação de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto* por PCR e PCR-RFLP. 2004. 63 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 113-118, Apr. 1993.

GARDES, M.; WHITE, T. J.; FORTIN, J. A.; BRUNS, T. D.; TAYLOR, J. W. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 1, p. 180-190, Jan. 1991.

GARGAS, A.; DEPRIEST, P. T. A nomenclature for fungal PCR *primers* with examples from intron-containing Ssr rDNA. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 5, p. 745-748, Sept./Oct. 1996.

GASPAR JÚNIOR, P. J. Requerimentos nutricionais e caracterização enzimática de isolados do cogumelo *Agaricus blazei*. 2003. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GÓES, L. B.; COSTA, A. B. L. da; FREIRE, L. L. C.; OLIVEIRA, N. T. DE. Randomly amplified polymorphic DNA of *Trichoderma* isolates and antagonism *Rhizoctonia solani*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 2, p. 151-160, Apr./June 2002.

GOMES, E. A. Caracterização molecular de fungos ectomicorrízicos por PCR-RFLP do rDNA, seqüenciamento da região ITS do rDNA e RFLP do DNA mitocondrial. 1999. 89 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GOMES, E. A.; BARROS, E. G.; KASUYA, M. C. M.; ARAÚJO, E. F. Molecular characterization of *Pisolithus* spp. isolates by rDNA PCR-RFLP. *Mycorrhiza*, New York, v. 8, n. 4, p. 197-202, Jan. 1999.

GOMES, E. A.; KASUYA, M. C. M.; BARROS, E. G. de; BORGES, A. C.; ARAÚJO, E. F. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 477-483, Dec. 2002.

GRIFFITHS, A. J. F. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 59, n. 4, p. 673-685, 1995.

HERION, B.; CHEVALIER, G.; MARTIN, F. Typing truffle by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research*, Cambridge, v. 98, n. 1, p. 37-43, Jan. 1994.

HERION, B.; LE TACON, F.; MARTIN, F. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist*, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 289-298, Oct. 1992.

HIGAKI, M.; EGUCHI, F.; WATANABE, Y. A stable culturing method and pharmacological effects of the *Agaricus blazei*. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, Tokyo, v. 110, p. 98-103, 1997. Supplement 1.

HIJRI, M.; HOSNY, M.; TUINEN, D. V.; DULIEU, H. Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. *Fungal Genetics and Biology*, San Diego, v. 26, n. 2, p. 141-151, Mar. 1999.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic interference. *Quarterly Review Biology*, Chicago, v. 66, n. 4, p. 411-430, Dec. 1991.

HOPPLE JR, J. S.; VILGALYS, R. Phylogenetic relationship in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, San Diego, v. 13, n. 1, p. 1-19, Oct. 1999.

HOWLETT, B. J. Genome analysis of the fungal plant pathogen, *Leptosphaeria maculans* using pulsed field gel electrophoresis. *Electrophoresis*, Deerfield Beach, v. 18, n. 9, p. 1544-1547, Aug. 1997.

HULBERT, S. H.; MICHELMORE, R. W. DNA restriction fragment length polymorphism and somatic variation in the lettuce downy mildew fungus, *Bremia lactucae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 1, n. 1, p. 17-24, Jan. 1988.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanism in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, Athens, v. 17, n. 1A, p. 277-284, Jan./Feb. 1997.

ITO, Y.; FUSHIMI, T.; YANAGI, S. O. Discrimination of species and strains of basidiomycete genus *Coprinus* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Mycoscience**, Tokyo, v. 39, p. 361-365, 1998.

ITOH, H.; ITO, H.; AMANO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a (1→6)-beta-D-glucan protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 66, n. 2, p. 265-271, Oct. 1994.

JUNGHANS, D. T.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, W. V.; BARROS, E. G.; ARAUJO, E. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, New York, v. 7, n. 5, p. 243-248, Jan. 1998.

KARÉN, O.; HOGBERG, N.; DAHLBERG, A.; JONSSON, L.; NYLUND, J. E. Inter and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 136, n. 2, p. 313-325, June 1997.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; KANAO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMUJRA, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 186, n. 2, p. 267-273, Mar. 1989.

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*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 183, n. 1, p. 150-154, 1988.

- KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom and its synonyms. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 12-24, Jan./Feb. 2005.
- KHUSH, R. S.; BECKER, E.; WACH, M. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2971-2977, Sept. 1992.
- KIM, D. H.; MARTYN, R. D.; MAGILL, C. W. Mitochondrial DNA (mtDNA) – Relatedness among *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 91-97, Jan. 1993.
- KIM, D. H.; MARTYN, R. D.; MAGILL, C. W. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 3, p. 346-353, Mar. 1992.
- KIM, S. H.; HAN, A.; KRONSTAD, J.; BREUIL, C. Differentiation of sapstain fungi by restriction fragment length polymorphism patterns in nuclear small subunit ribosomal DNA. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 151-157, Aug. 1999.
- KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.
- LABORY, C. R. **Avaliação citológica e condições de crescimento de *Agaricus blazei***. 2003. 60 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LANA, T. G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso***. 2004. 91 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZÁLEZ, V.; JULIÁN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 2/3, p. 187-194, Oct. 1999.
- LARRAYA, L. M.; PÉREZ, G.; RITTER, E.; PISABARRO, A. G.; RAMÍREZ, L. Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5290-5300, Dec. 2000.



LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; CARDER, J. H.; BURROWS, P. R.; PEBERDY, J. F. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, n. 3, p. 257-265, Mar. 1997.

LEAL JÚNIOR, G. A. **Diagnóstico de *Crinipellis pernicioso* em tecidos infectados de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e sorológica de isolados coletados de vários hospedeiros**. 2002. 136 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

LEONARDI, M.; PAOLOCCI, F.; RUBINI, A.; SIMONINI, G.; PACIONI, G. Assessment of inter-and intra-specific variability in the main species of *Botetulus edulis* complex by ITS analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, n. 2, p. 411- 416, Feb. 2005.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2001. Cap. 4, p. 93-99.

LOFTUS, M. G.; MOORE, D.; ELLIOTT, T. J. DNA polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 712-718, 1988.

LYONS, G. A.; McKAY, G. J.; SHARMA, H. S. S. Molecular comparison of *Scytalidium thermophilum* isolates using RAPD and ITS nucleotide sequence analyses. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 12, p. 1431-1438, Dec. 2000.

MAIWALD, M.; KAPPE, R.; SONNTAG, H-G. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and enzyme analysis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 115-122, 1994.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianth from carnation. **Phytopatology**, St. Paul, v. 84, n. 1, p. 98-101, Jan. 1993.

MARMEISSE, R.; DEBAUD, J. C.; CASSELTON, L. A. DNA probes for species and strain identification in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 3, p. 161-165, Mar. 1992.

MARQUES, J. M.; PAIVA, M. R.; URBEN, A. F.; BUSO, G. S. C. Estudo de diferenças genotípicas entre acessos de *Agaricus blazei*. In: SIMPÓSIO

INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2., 2004, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília, 2004. p. 185-186. (Documentos, 116).

MESQUITA, A. G. G. **Análise molecular de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* por marcadores RAPD.** 1997. 51 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MICHELMORE, R. W.; HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 383-404, 1987.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 21, p. 828-832, Nov. 1991.

MIGHELI, Q.; BERIO, T.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Electrophoretic karyotype variation among pathotypes of *Fusarium oxysporum* f-sp dianthi. **Plant Pathology**, Baltimore, v. 44, n. 2, p. 308-315, 1995.

MILGROOM, M. G.; LIPARI, S. E.; POWELL, W. A. DNA fingerprinting and analysis of population structure in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Genetics**, Baltimore, v. 131, n. 2, p. 297-306, June 1992.

MIZUNO, T.; Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murill: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, Madison, v. 11, n. 1, p. 167-172, 1995.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, Nov. 1990.

MURAGUCHI, H.; ITO, Y.; KAMADA, T.; YANAGI, S. O. A linkage map of the basidiomycete *Coprinus cinereus* based on random amplified polymorphic DNAs and restriction fragment length polymorphisms. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 40, n. 2, p. 93-102, Nov. 2003.

NASCIMENTO, A. M. do; MARTINEZ-ROSSI, N. M. 18S-rDNA sequencing, enzyme patterns and morphological characterization of *Trichophyton* isolates.

**Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 179-186, July/Sept. 2001.

NEALE, D. B.; DEVEY, M. E.; JERMSTAD, K. D.; AHUJA, M. R.; ALOSI, M. C. MARSHAL, K. A. Use of DNA markers in forest tree improvement research. **New Forest**, Albany, v. 5, n. 1, p. 1-17, 1992.

OLIVEIRA, V. C. de; COSTA, J. L. S. da. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 631-634, nov./dez. 2002.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. **Yakugaku Zasshi**, Kyoto, v. 114, n. 5, p. 342-350, May 1994.

OTERO, L.; DUCASSE, D.; MILLER, R. N. G. Variability in ribosomal DNA genic and spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different host. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 441-446, jul./ago. 2004.

OTOYA, M. M.; RESTREPO, S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Amplificación al azar del AND polimórfico para evaluar la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Colombiana**, Santa Fé de Bogota, v. 19, n. 1, p. 7-14, 1995.

PAAVANEN-HUHTALA, S.; HYVÖNEN, J.; BULAT, S. A.; YLI-MATTILA, T. RAPD-PCR, Isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates, **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 5, p. 625-634, May 1999.

PIPE, N. D.; CHANDLER, D.; BAINBRIDGE, B. W.; HEALE, J. B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 485-491, Apr. 1995.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, Jan. 1985.

RAMIREZ, L.; MUEZ, V.; ALFONSO, M.; BARRENECHEA, A. G.; ALFONSO, L.; PISABARRO, A. G. Use of molecular markers to differentiate

between commercial strains of the button mushroom *Agaricus bisporus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 198, n. 1, p. 45-48, Apr. 2001.

RISTAINO, J. B.; MADRITCH, M.; TROUT, C. L.; PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 948-954, Mar. 1998.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 9, n. 5, p. 509-520, 1987.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.70**. New York, 1992. 470 p.

ROUX, P.; LABARERE, J. Isozyme characterization of dikariotic strains of the edible basidiomycete *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*). **Experimental Mycology**, San Diego, v. 14, n. 2, p. 101-112, June 1990.

ROYSE, D. J.; MAY, B. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. **Mycologia**, New York, v. 74, n. 1, p. 93-102, Jan./Feb. 1982.

SANTOS, A. M. P. V. dos; MATSUMURA, A. T. S.; VAN DER SAND, S. T. Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by random amplified polymorphic DNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 243-250, June 2002.

SIQUEIRA, P. O uso dos cogumelos na alimentação e na gastronomia brasileira. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NA ALIMENTAÇÃO, SAÚDE, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE NO BRASIL, 1., 2002, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, 2002. p. 88-92. (Documentos, 88).

SCHOTS, A.; DEWEY, F. M.; OLIVER, R. **Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification**. Cambridge: CAB International, 1994. p. 267.

STIJVE, T.; AMAZONAS, M. A. L. de A.; GILLER, V. Flavour and taste components of *Agaricus blazei* ss. Heinem: a new gourmet and medicinal mushroom. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Stuttgart, v. 98, p. 448-453, 2002.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. D. G. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 651-655, nov./dez. 2004.

TIGANO, M. S.; ALJANABI, S.; MELLO, S. C. M. de. Genetic variability of Brazilian *Alternaria* spp. isolates as revealed by RAPD analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 117-119, Apr./June 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827 p.

VANKAN, J. A. L.; GOVERSE, A.; VANDERVLUGTBERGMAN, C. J. B. Electrophoretic karyotype analysis of *Botrytis cinerea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 99, n. 3, p. 119-128, 1993. Supplement.

VIAUD, M.; PASQUIER, A.; BRYGOO, Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 9, p. 1027-1032, Sept. 2000.

VILGALYS, R.; GONZALEZ, D. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. **Current Genetics**, New York, v. 18, n. 3, p. 277-280, Oct. 1990.

WANDERLEI-SILVA, D.; RAMALHO NETO, E.; HANLIN, R. Molecular systematics of the Phyllachorales (ascomycota, fungi) based on 18S ribosomal DNA sequences. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 3, p. 315-322, July/Sept. 2003.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. de A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. da. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Dordrecht, v. 4, p. 267-290, 2002.

WATSON, J. D.; HOPKINS, N. H.; ROBERTS, J. M.; STEITZ, J. A.; WERNER, A. M. **Molecular biology of the gene**. 4. ed. Menlo Park, W. A. Benjamin/Cummings, 1987. 744 p.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: a**

guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

ZADRAZIL, F.; GRABBE, K. Edible Mushrooms. In: REHM, H. J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemil, 1983. v. 3, n. 1, p. 146-187.

ZERVAKIS, G.; SOURDIS, J.; BALIS, C. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus ostreatus* species based on isozyme analysis. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, p. 329-341, 1994.

ZHANG, Y.; MOLINA, F. I. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 17-20, 1995.

ZIMAND, G.; VALINSKI, L.; ELAD, Y.; CHET, I.; MANULIS, S. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 5, p. 531-534, May 1994.

## ANEXOS

### ANEXO A

Página

TABELA 1A Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas de RAPD.....	79
--	----

### ANEXO B

Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região ITS do rDNA de isolados de <i>A. bisporus</i> e <i>A. blazei</i> .....	88
--	----

### ANEXO C

Alinhamento de seqüências de nucleotídeos de parte do gene 18S do rDNA de isolados de <i>A. bisporus</i> e <i>A. blazei</i> .....	90
---	----

TABELA 1A Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas de RAPD.

Bandas*	Isolados										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
B7a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7c	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
B7d	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B7f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7g	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7i	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L2a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L2b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L2c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L2d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L2e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L2f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L2g	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L2h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L6a	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L6b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L6c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L6d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L6e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L6f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L6g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L6h	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L8a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L8b	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L8c	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L8d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L8e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L8f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L10a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L10b	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
L10c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L10d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L10e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L10f	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
L10g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L14a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L14b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L14c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L14d	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L14e	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L14f	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L14g	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L15a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L15c	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L15d	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L15e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L15f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1

CONTINUA...



TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

Bandas*	<i>Isolados</i>										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
L15g	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L15h	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L15i	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L15j	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15l	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L15m	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L16a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L16b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L16c	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L16d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L16e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L16f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L18a	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
L18b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L18c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L18d	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
M7a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M7b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M7c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M7d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M7e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M7f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M7g	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M7h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M7i	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M8a	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M8b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M8c	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M8d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M8e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M8f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M8g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M8h	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M9a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M9c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9d	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
M9e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M9f	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9h	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9i	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9j	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9l	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M9m	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9n	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M9o	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M9p	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M10a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M10b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M10c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

CONTINUA...

TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

Bandas*	Isolados										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
M10d	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M10e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M10f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M10g	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M10h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M10i	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M10j	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M10l	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M10m	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M10n	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M11a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M11b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M11c	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
M11d	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M11e	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
M11f	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M11g	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
M11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M11i	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M11j	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M11l	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
M11m	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M11n	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M11o	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M11p	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M13a	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M13b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M13c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M13d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M13e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M13f	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M14a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M14b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M14c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M14d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M14e	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M14f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M15a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M15b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M15c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M15d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M15e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M15f	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M15g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M15h	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M15i	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M16a	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M16b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M16c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M16d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M16e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

CONTINUA...

TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

Bandas*	Isolados										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
M16f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M16g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M16h	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M16i	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M16j	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M19a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M19b	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M19c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M19d	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M19e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M19f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M19g	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M19h	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M20c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN1a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN1b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN1c	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AN1d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN1e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN1f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AN1g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN6a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN6b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN6c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN6d	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AN6e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN6f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN12a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN12b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN12c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN12d	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN12e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN12f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN12g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN12h	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN12i	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AN12j	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN13a	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AN13b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN13c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN13d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN13e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN13f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN13g	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN14a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN14b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN14c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

CONTINUA...

TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

Bandas*	Isolados										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
AN14d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN14e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN14f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN14g	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN14h	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN14i	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN14j	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN14l	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AN14m	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AN14n	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN14o	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AN14p	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN15a	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AN15b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN15c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN15d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN15e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN15f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN15g	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN15h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN15i	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN15j	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN17a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN17b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN17c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN17d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN17e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AN17f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AN18a	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN18b	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AN18c	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AN18d	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AN18e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN18f	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AN18g	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN18h	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AN18i	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
AN18j	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN18l	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AN18m	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AN18n	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN18o	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AN18p	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AN18q	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ6a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ6b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ6c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ6d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ6e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ6f	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
AQ6g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CONTINUA...

TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

<i>Bandas*</i>	<i>Isolados</i>										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
AQ6h	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ6i	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
AQ10a	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AQ10b	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ10c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ10d	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ10e	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
AQ10f	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AQ10g	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ10h	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AQ10i	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ12a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ12b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ12c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ12d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ12e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ12f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ12g	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ12h	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AQ14a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ14b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ14c	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ14d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ14e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ14f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ18a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ18b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ18c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ18d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ18e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ18f	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AQ18g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ18h	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ18i	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ18j	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ18l	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AQ18m	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ18n	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AQ18o	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AQ18p	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AT20a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AT20b	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
AT20c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AT20d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AT20e	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AT20f	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AT20g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU14a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU14b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU14c	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AU14d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CONTINUA...

TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

Bandas*	Isolados										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
AU14e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AU14f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU14g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU15a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU15b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU15c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU15d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU15e	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AU15f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AU15g	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AU15h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU15i	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU15j	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU17a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU17b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU17c	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AU17d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU17e	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU17f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU17g	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AU17h	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU17i	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU17j	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AU17l	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AU17m	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AU17n	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW4a	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
AW4b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW4c	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
AW4d	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
AW4e	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW4f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW4g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW8a	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AW8b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW8c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW8d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW8e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AW8f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AW8g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW8h	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW8i	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AW8j	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AW8l	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW8m	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW10a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW10b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW10c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW10d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW10e	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AW10f	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1

CONTINUA...

TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

<i>Bandas*</i>	<i>Isolados</i>										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
AW10g	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW10h	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW10i	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW12a	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW12b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW12c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW12d	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AW12e	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AW12f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW12g	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AW12h	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AW14a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW14b	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW14c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW14d	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AW14e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW14f	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW14g	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AW14h	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW14i	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW14j	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW16a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AW16b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW16c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW16d	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AW16e	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
AW16f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW16g	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AW16h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW16i	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AW16j	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW16l	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AW16m	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW18a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW18b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW18c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW18d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW18e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW18f	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AW18g	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AX18a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AX18b	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AX18c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AX18d	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AX18e	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AX20a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AX20b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AX20c	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AX20d	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AX20e	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AX20f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CONTINUA...

TABELA 1A Cont.: Matriz de 0 e 1 obtida pelos padrões de bandas polimórficas

Bandas*	Isolados										
	CHP	PB	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9
AX20g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ4a	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AZ4b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ4c	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AZ4d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ4e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ4f	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ4g	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AZ4h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ4i	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AZ12a	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ12b	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AZ12c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ12d	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AZ12e	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ12f	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
AZ12g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ12h	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ16a	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
AZ16b	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
AZ16c	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ16d	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ16e	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
AZ16f	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AZ16g	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ16h	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AZ16i	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ16j	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ16l	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AZ16m	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ16n	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ18a	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AZ18b	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ18c	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AZ18d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ18e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZ18f	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1

\*Cada banda está identificada pelo nome do *primer* seguida de uma letra do alfabeto. A letra "a" corresponde à banda de maior tamanho e as demais letras em ordem alfabética, indicam as bandas de tamanhos decrescentes. Foram analisadas apenas as bandas fortes, de um total de 50 *primers* aleatórios.



**ANEXO B: Alinhamento de seqüências de nucleotídeos da região ITS do rDNA de isolados de *A. bisporus* e *A. blazei*.**

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
                10      20      30      40      50
CHP  CTGGACTTCA TTTTCATCCA CCTGTGCACC TTTTGTAGTC TTTTTCAGGT
PB    -----CATCCA CCTGTGCACC TTTTGTAGTC TTTTTCAGGT
CS1  -----
CS2  -----
CS5  -----
CS9  -----

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
                60      70      80      90     100
CHP  ATTGGAGGAA GTGGTCAGCC TATCAGCTCT TTGCTGGATG TAAGGACTTG
PB    ATTGGAGGAA GTGGTCAGCC TATCAGCTCT TTGCTGGATG TAAGGACTTG
CS1  -----
CS2  -----
CS5  -----
CS9  -----

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
                110     120     130     140     150
CHP  CAGTGTGAAA ACAGTGCTGT CCTTTACCTT GGCCATGGAA TCTTTTTCTT
PB    CAGTGTGAAA ACAGTGCTGT CCTTTACCTT GGCCATGGAA TCTTTTTCTT
CS1  -----
CS2  -----
CS5  -----
CS9  -----

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
                160     170     180     190     200
CHP  GTTAGAGTCT ATGTTATTCA TTATACTCTT AGAATGTCAT TGAATGTCTT
PB    GTTAGAGTCT ATGTTATTCA TTATACTCTT AGAATGTCAT TGAATGTCTT
CS1  GAGTCTATGT CACTCATTAT ACTCTGTCGA ATGTCATTGA ATGTCCTTAC
CS2  -----
CS5  -----TGT CACTCATTAT ACTCTGTCGA ATGTCATTGA ATGTCCTTAC
CS9  GAGTCTATGT CACTCATTAT ACTCTGTCGA ATGTCATTGA ATGTCCTTAC

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
                210     220     230     240     250
CHP  TACATGGGCT ATGCCTATGA AAATTATTAT ACAACTTTCA GCAACGGATC
PB    TACATGGGCT ATGCCTATGA AAATTATTAT ACAACTTTCA GCAACGGATC
CS1  ATGGGCTTGT ATGCCTATGA AAATTGTAAT ACAACTTTCA GCAACGGATC
CS2  ATGGGCTTGT ATGCCTATGA AAATTGTAAT ACAACTTTCA GCAACGGATC
CS5  ATGGGCTTGT ATGCCTATGA AAATTGTAAT ACAACTTTCA GCAACGGATC
CS9  ATGGGCTTGT ATGCCTATGA AAATTGTAAT ACAACTTTCA GCAACGGATC

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
                260     270     280     290     300
CHP  TCTTGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT
PB    TCTTGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT
CS1  TCTTGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT
CS2  TCTTGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT
CS5  TCTTGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT
CS9  TCTTGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT

```

CONTINUA...

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      310      320      330      340      350
CHP   GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGCCTC
PB    GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGCCTC
CS1   GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGCCTC
CS2   GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGCCTC
CS5   GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGCCTC
CS9   GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGCCTC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      360      370      380      390      400
CHP   CTTGGTATTC CGAGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATTAT ATTCTCAACT
PB    CTTGGTATTC CGAGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATTAT ATTCTCAACT
CS1   CTTGGTATTC CGAGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATTAA ATTCTCAACT
CS2   CTTGGTATTC CGAGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATTAA ATTCTCAACT
CS5   CTTGGTATTC CGAGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATTAA ATTCTCAACT
CS9   CTTGGTATTC CGAGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCATTAA ATTCTCAACT

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410      420      430      440      450
CHP   CTCCAATACT TTGTTGTAAA GGAGAGCTTG GATTGTGGAG GTTTGCTGGC
PB    CTCCAATACT TTGTTGTAAA GGAGAGCTTG GATTGTGGAG GTTTGCTGGC
CS1   CTCTTATACT TTTTGTAAA  AGAGAGCTTG GACTGTGGAG GCTTGCCTGGC
CS2   CTCTTATACT TTTTGTAAA  AGAGAGCTTG GACTGTGGAG GCTTGCCTGGC
CS5   CTCTTATACT TTTTGTAAA  AGAGAGCTTG GACTGTGGAG GCTTGCCTGGC
CS9   CTCTTATACT TTTTGTAAA  AGAGAGCTTG GACTGTGGAG GCTTGCCTGGC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      460      470      480      490      500
CHP   TCCTTACTTG GGGTCAGCTC CTCTGAAATG CATTAGCGGA ATCGTCTGCG
PB    TCCTTACTTG GGGTCAGCTC CTCTGAAATG CATTAGCGGA ATCGTCTGCG
CS1   CACTT-TTTG GGGTCAGCTC CTCTGAAATG CATTAGCGGA ACCGTTTGCG
CS2   CACTT-TTTG GGGTCAGCTC CTCTGAAATG CATTAGCGGA ACCGTTTGCG
CS5   CACTT-TTTG GGGTCAGCTC CTCTGAAATG CATTAGCGGA ACCGTTTGCG
CS9   CACTT-TTTG GGGTCAGCTC CTCTGAAATG CATTAGCGGA ACCGTTTGCG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      510      520      530      540      550
CHP   ATCTGCCACA AGTGTGATAA CTTATCTACA CTGGCGAGGG GATTGCTTTC
PB    ATCTGCC--- -----
CS1   ATCTGCCACA AGTGTGATAA GTTATCTACG CTGGCGAGGG GATTGCTTTC
CS2   ATCTGCCACA AGTGTGATAA GTTATCTACG C-----
CS5   ATCTGCCACA AGTGTGATAA GTTATCTACA CTGGCGAGGG GATTGCTTTC
CS9   ATCTGCCACA AGTGTGATAA GTTATCTACG CTGGCGAGGG GATTGCTTTC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      560      570      580      590      600
CHP   TGATGTTTCAG CTTCTAATCG TCTAAGGACA ATTTCTTGAA T-----
PB    TGATGTTTCAG CTTCTAATCG TCTAAGGACA ATTTCTTGAA T-----
CS1   TGTAATGTTC -----
CS2   TGTAATGTTC -----
CS5   TGTAATGTTC AGCTTCTAAT TGTC-----
CS9   TGTAATGTTC AGCTTCTAAT TGTC-----

```

**ANEXO C: Alinhamento de seqüências de nucleotídeos de parte do gene 18S do rDNA de isolados de *A. bisporus* e *A. blazei*.**

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		10	20	30	40	50
CHP	-----	---ACTTGCC	CTCCAATGT	TCCTCGTTAA	GGGATTAAAA	
PB	CTGCTGGCAC	CAGACTTGCC	CTCCAATGT	TCCTCGTTAA	GGGATTAAAA	
CS1	-----	-----	-----	-----TAA	GGGATTAAAA	
CS2	-----	-----	-----	TCCTCGTTAA	GGGATTAAAA	
CS3	-----	-----	-----	-----A	GGGATTAAAA	
CS4	-----	-----	-----	-----CGTTAA	GGGATTAAAA	
CS5	-----	-----	-----	-----TCGTTAA	GGGATTAAAA	
CS6	-----	-----	-----	-----	-----	
CS7	-----	-----	-----	-----	-----TTTAAA	
CS8	-----	-----	-----	-----	-----	
CS9	-----	-----	-----	-----	-----	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		60	70	80	90	100
CHP	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
PB	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS1	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS2	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS3	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS4	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS5	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS6	----ACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS7	TTGTACTCAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS8	-----CAT	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
CS9	-----	TCCAATTATA	AGACCCGAAA	GAGCCCTATA	TTGTTATTTA	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		110	120	130	140	150
CHP	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
PB	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS1	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS2	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS3	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS4	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS5	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS6	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS7	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS8	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
CS9	TTGTCACTAC	CTCCCCGTGT	CGGGATTGGG	TAATTTGCGC	GCCTGCTGCC	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		160	170	180	190	200
CHP	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
PB	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS1	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS2	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS3	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS4	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS5	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS6	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS7	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS8	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	
CS9	TTCTTGGAT	GTGGTAGCCG	TTTCTCAGGC	TCCTCTCCG	GAATCGAACC	

CONTINUA...

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210          220          230          240          250
CHP    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
PB     CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS1    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS2    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS3    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS4    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS5    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS6    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS7    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS8    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC
CS9    CTTATTCCCC GTTACCCGTT GAAACCATGG TAGGCCTCTA TCCTACCATC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260          270          280          290          300
CHP    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
PB     GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS1    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS2    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS3    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS4    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS5    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS6    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS7    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS8    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA
CS9    GAAAGTTGAT AGGGCAGATA TTTGAATGAA GCATCGCCGG CACAAGGCCA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310          320          330          340          350
CHP    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
PB     TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS1    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS2    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS3    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS4    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS5    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS6    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS7    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS8    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT
CS9    TGCGATTCGA GAAGTTATTA TGAATCACCA AGGGAGCGGC GAACCCGTT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360          370          380          390          400
CHP    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
PB     GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS1    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS2    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS3    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS4    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS5    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS6    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS7    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS8    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC
CS9    GGTTTTTTAT CTAATAAATA CACCCCTTCC GGAAGTCGGG GCTTGATTGC

```

CONTINUA...

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410      420      430      440      450
CHP ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
PB  ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS1 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS2 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS3 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS4 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS5 ATGTATTAGC TGTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS6 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS7 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS8 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC
CS9 ATGTATTAGC TCTAGAATTA CCACAGTTAT CCATGTAGCA AGGTATCATC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      460      470      480      490      500
CHP AAATAAACTA TAACTGATT AATGAGCCAT TCGCAGTTC ACAGTACAAA
PB  AAATAAACTA TAACTGATT AATGAGCCAT TCGC-----
CS1 AAATAAACTA TAACTGATT AATGAGCCAT TCGCAGT---
CS2 AAATAAACTA TAACTGATT AATGAGCCAT TCGCA-----
CS3 AAATAAACTA TAACTGATT AATGAGCCAT TCGCAGTTC ACAGTACAAA
CS4 AAATAAACTA TAACTGATT AATGAGCCAT TCGCAGTTC ACAGTACAAA
CS5 AAATAAACTA TAAC-----
CS6 AAATAAACTA TAAC-----
CS7 AAATAAACTA TAACTG---
CS8 AAATAAACTA TAACTGA---
CS9 AAATAAACTA TAACTGATT AATGAGCCAT T-----

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      510      520      530      540      550
CHP TTTGTTTATA CTTAGACATG CATGGCTTAA TCTTTGAGAC A-----
PB  -----
CS1 -----
CS2 -----
CS3 TTTGTTTATA CTTAGACATG CATGGCTTAA TCTTTG---
CS4 TTTGTTTATA CTTAGACATG CATGGCTTAA TCTTTGAGAC AAGCATATGA
CS5 -----
CS6 -----
CS7 -----
CS8 -----
CS9 -----

```